



HAL
open science

Caractérisation du rôle fonctionnel des sous-unités MEI-1 et MEI-2 dans la régulation de l'activité de coupure des microtubules de la Katanine chez *C. elegans*

Eva Beaumale

► To cite this version:

Eva Beaumale. Caractérisation du rôle fonctionnel des sous-unités MEI-1 et MEI-2 dans la régulation de l'activité de coupure des microtubules de la Katanine chez *C. elegans*. Biologie cellulaire. Université Paris Cité, 2022. Français. NNT : 2022UNIP5141 . tel-04611781

HAL Id: tel-04611781

<https://theses.hal.science/tel-04611781>

Submitted on 14 Jun 2024

HAL is a multi-disciplinary open access archive for the deposit and dissemination of scientific research documents, whether they are published or not. The documents may come from teaching and research institutions in France or abroad, or from public or private research centers.

L'archive ouverte pluridisciplinaire **HAL**, est destinée au dépôt et à la diffusion de documents scientifiques de niveau recherche, publiés ou non, émanant des établissements d'enseignement et de recherche français ou étrangers, des laboratoires publics ou privés.



Thèse de Doctorat

Université Paris Cité

Ecole Doctorale BioSPC ED562 – spécialité Développement

Institut Jacques Monod

Laboratoire Cycle Cellulaire et Développement

Caractérisation du rôle fonctionnel des sous-unités MEI-1 et MEI-2, dans la régulation de l'activité de coupure des microtubules de la Katanine chez *C. elegans*

Présentée par Eva Beaumale

Thèse réalisée sous la direction de Nicolas Joly

Soutenue publiquement le 30 novembre 2022

Composition du jury de thèse :

Denis Chrétien,

DR CNRS, Université de Rennes 1, Institut de Génétique et Développement de Rennes

Rapporteur

Benjamin Lacroix,

CR-HDR CNRS Université de Montpellier, Centre de Recherche en Biologie cellulaire de Montpellier

Rapporteur

Virginie Rouiller-Fabre,

PU, Université Paris Cité, CEA

Examinatrice

Guillaume Romet-Lemonne,

DR CNRS, Université Paris Cité, Institut Jacques Monod

Examinateur

Virginie Stoppin-Mellet,

Professeur associé, Université Grenoble-Alpes, Institut de Neurosciences de Grenoble

Examinatrice

Julie Welburn,

Senior Lecturer, The University of Edinburgh, Wellcome Trust Centre for Cell Biology

Membre invité

Nicolas Joly,

CR CNRS HDR, Université Paris Cité, Institut Jacques Monod

Directeur de thèse

Remerciements

Beaucoup de travail, de fatigue, de désillusion, de frustration, mais tellement de surprises, de beauté, d'émerveillement, de fierté, de partage et de reconnaissance, au cours de cette expérience qu'est la thèse, ma thèse. J'aimerais remercier personnellement toutes les personnes qui ont contribué à mon travail de thèse, qui m'ont appris, qui m'ont conseillé, qui m'ont aidé, qui m'ont écouté, qui m'ont soutenu, qui m'ont motivé, qui ont posé les bons mots aux bons moments, à toutes celles qui m'ont fait sourire, qui m'ont partagé leur joie, qui m'ont éveillé, qui m'ont ouvert l'esprit, qui m'ont fait rêver et qui ont rendu les choses plus simples. Merci à vous.

Je tiens tout d'abord à remercier l'ensemble des membres de mon jury de thèse : **Virginie Rouiller-Fabre, Benjamin Lacroix, Julie Welburn, Denis Chrétien, Guillaume Romet-Lemonne et Virginie Stoppin-Mellet** pour avoir accepté d'évaluer mon travail de thèse.

Je remercie les membres de mon comité de suivi de thèse, **Guillaume Romet-Lemonne et Michel Labouesse**, pour leur disponibilité, leurs conseils et les discussions scientifiques constructives que nous avons eu au cours de ma thèse.

Je remercie particulièrement mon directeur de thèse, **Nicolas Joly**. Tout d'abord, un grand merci pour m'avoir donné cette chance de travailler avec toi sur le projet « Katanin » et de m'avoir accompagnée tout au long de ma thèse. Pendant ces cinq années, le parcours n'a pas été simple, avec des résultats inattendus et une gestion de mon stress qui était parfois bien difficile. Je te remercie d'avoir toujours été très positif et patient avec moi, ce qui m'a aidé à avoir (un petit plus) confiance en moi et en mon travail. Je te remercie pour la rigueur scientifique que tu m'as transmise, et ta passion pour la recherche en biologie mais surtout cet intérêt pour la biochimie, qui était pour moi très obscure avant de commencer mes premières purifications de protéines... Je te remercie pour ta disponibilité à tout moment, je t'ai beaucoup sollicité et tu as toujours été présent, que ce soit à la paillasse, en réunions, mais aussi au cours de ce long confinement. Je suis très reconnaissante de tout ce temps que tu m'as accordé. Je te remercie pour ton écoute, ta compréhension et ta bienveillance. Je te remercie de m'avoir poussé à faire plus, mais surtout à faire mieux, de m'avoir beaucoup aidé et d'avoir toujours valorisé mon travail. Cela a été vraiment bénéfique pour moi, et ce jusqu'au bout de la thèse. Aujourd'hui, je suis très heureuse du travail qu'on a pu réaliser ensemble et avec l'aide de l'équipe. Alors, un grand Merci.

Je remercie **Lionel Pintard** pour avoir m'acceptée dans son équipe tout d'abord pour réaliser mon stage de L3 avec Lisa, puis en M2 et enfin en thèse. Merci pour ta confiance, ta disponibilité et ta patience au cours de ces 5 années. Merci pour toutes les discussions constructives que nous avons partagées et tous les précieux avis et conseils scientifiques que tu m'as donnés.

Je souhaite aussi remercier l'ensemble des membres passés et présents de mon laboratoire, qui ont contribué à mon travail et qui m'ont beaucoup appris, aidé, soutenu et encouragé tout au long de ma thèse.

Lucie Van Hove, merci pour ta disponibilité à toute heure, tes injections de vers plus que efficaces ainsi que ta mémoire infallible qui m'a bien rendu service et qui m'impressionnera toujours.

Batool Ossareh-Nazari, merci pour tes précieux conseils scientifiques bien sûr, mais aussi personnels et humains. Merci pour ta bienveillance et ta sagesse. Merci aussi pour ce partage de paillasse qui a été fort agréable.

Lisa Martino-Porebski, merci d'avoir eu cette confiance en moi d'une potentielle chercheuse dès le premier jour de mon stage de L3 et de m'avoir transmis ta passion et ton enthousiasme pour la recherche. Je te remercie pour la motivation et la force que tu m'as donné pendant ce stage qui m'a aidé tout au long de ma thèse. Tu as été et tu resteras un exemple de persévérance et de réussite pour moi.

Yann Thomas, Milady te remercie pour tous les bons moments de rire et d'anecdotes racontées à merveille. Merci pour les petits dessins et les blagues dans les cahiers de notes que je découvrais des mois plus tard. Merci aussi de m'avoir rassurée et encouragée à de nombreuses reprises lorsque mon stress était (un peu trop) envahissant.

Griselda Velez Aguilera, thank you for your kindness, your generosity, and your scientific advices which were always good. You are a really talent researcher, I wish you the best for the future. I sincerely hope we will meet in Mexico next time, there are still so many states I would like to visit!

Nicolas Tavernier, merci pour ta bonne humeur et les moments de rires entre deux purifs. Je retiens surtout tes expressions de Savoyard, tes entrées spectaculaires dans le bureau, tes ventes Leboncoin (plutôt insistantes), et puis ce fameux jour où tu as voulu m'éliminer avec une flaque de bactéries...

Sylvia Nkombo Nkoula, cette expérience de thèse, on l'aura vécu ensemble, alors un grand merci d'avoir été présente, à l'écoute, de m'avoir soutenue. Je te remercie d'avoir compris, de m'avoir appris, et de m'avoir partagé tellement de choses. On a passé de si bons moments ensemble, je suis très heureuse de te compter parmi mes proches aujourd'hui. Tu le sais, je te souhaite le meilleur pour ta nouvelle vie.

Anaïs Pillan, merci pour ta douceur, ta générosité, ton humour et toutes tes idées lumineuses pour l'organisation d'événements. Merci pour tes mots réconfortants, tes adorables attentions et ces discussions tardives dans notre « salle de pause » pleines de surprises qui m'ont fait tellement rire.

Ludivine Roumbo, tu resteras une Kataniste pour toujours. Merci pour les partages de manips qui ont toujours été avec rire, rigueur et autodérision, même après de longues heures tardives de comptage d'embryons, de RNAi surpuissants et de révélation ratée du blot sacré... Je suis très heureuse d'avoir pu travailler avec toi, je te remercie pour ton authenticité, ton humour et ton soutien.

Philippine Ormancey, dernière recrue de l'équipe, tu es arrivée avec ton sourire, ta gentillesse et ta fraîcheur. Merci pour tous les bons moments que nous avons passés ensemble avec Anaïs et Ludivine. Votre enthousiasme, votre spontanéité et votre humour ont été une réelle source de bien-être pour cette fin de thèse. Merci à toutes les trois (même si, au fond, vous restez quand même des sorcières).

Je remercie l'ensemble des membres des plateformes **ImagoSeine** et **Protéoseine** à l'IJM pour leur expertise et leur disponibilité.

Je remercie **Norry Baouz** et **Jonathan Lopez Arnaiz** d'avoir toujours répondu présents au magasin pour tous les dépannages de dernières minutes au beau milieu d'une manip (extrêmement importante). Mais surtout, un grand merci pour votre joie de vivre et tous ces bons moments à chaque passage au magasin. Evidemment je restais bien plus longtemps que prévu, mais c'était un réel plaisir

de partager ce temps avec vous. Merci aussi, pour les invitations aux dégustations privées des merveilleux gâteaux de Jonathan.

J'aimerais aussi remercier toutes les belles personnes que j'ai rencontrées à l'IJM :

Maëlys Loh, merci pour ta délicatesse et ta bienveillance. Nous avons partagé de nombreux questionnements et de doutes, mais finalement c'était toujours réconfortant et encourageant. Merci d'avoir été présente avec toute ta douceur et ton affection.

Layla El Mossadeq, merci pour ta générosité, ta bonté et tes douces attentions. Merci aussi pour tous ces petits verres en terrasse avec Sylvia, c'était un réel plaisir de partager ces moments avec vous.

Hugo Siegfried, merci pour toutes nos pauses café/chocolat/coca pleines d'humour, de rêves de voyage au bout du monde et de soutien mutuel.

Isabelle Becam, merci pour tous nos partages de moments de vie. Une déconnexion qui était toujours très agréable et pleine de bonne humeur. Merci aussi pour tes mots gentils, apaisants et encourageants.

Un grand merci aussi à **Aurélien Perrier, Mélanie Aubry, Abir El Farkouchi, Amina Zemouri, Bénédicte Lefèvre, Marina Antunes, Matthieu Sanial, Samia Miled, Noémie Gaudin, Line Manceau, Jérémy Poulet-Benedetti** et **Laetitia Herman** pour tous les bons moments que nous avons pu partager ensemble.

Elise et **Rajaa**, merci à toutes les deux pour votre soutien. Merci de prendre le temps, de partager, et de se réjouir avec moi. Vous êtes un réel support au quotidien. J'admire votre détermination et votre dévouement. Que les pique-niques à Vincennes, les cocktails et les bons gâteaux continuent !

François et **Brieuc**, merci de savoir tout tourner au rire. 10 ans plus tard, c'est toujours avec la même énergie, le même enthousiasme et la même folie, que l'on partage nos meilleurs moments. Merci pour votre spontanéité, votre humour (parfois pas ouf) et votre sincérité.

Je remercie aussi **Florence** et **François** avec qui j'ai beaucoup partagé mes ressentis et mes émotions et qui ont toujours été à l'écoute.

Je remercie mes **parents** pour m'avoir soutenu de façon inconditionnelle durant mes études et ma thèse. Je vous remercie de m'avoir transmis vos belles valeurs ainsi que cette soif d'apprendre et de toujours persévérer. Un immense merci pour m'avoir donné tout ce vous pouviez pour me rendre heureuse et épanouie dans ma vie et mes études. Merci pour tous ces week-ends de déconnexion en famille avec **Damien, Trécy** et maintenant **Lya**, qui m'ont ressourcé et donné toute la motivation et la confiance nécessaires pour poursuivre mon travail de thèse. Je vous remercie aussi pour tous vos gestes et vos mots du quotidien qui réchauffent le cœur.

Enfin, je remercie **Arthur** qui m'offre chaque jour son soutien sans limite. Merci de croire en moi, de me supporter, de me rassurer, de voir le positif de toute situation, de poser les mots justes et de rendre la vie plus simple. Merci pour l'équilibre et la tendresse que tu m'apportes au quotidien qui rendent notre vie toujours meilleure.

Résumé de la thèse

Caractérisation du rôle fonctionnel des sous-unités MEI-1 et MEI-2 dans la régulation de l'activité de coupure des microtubules de la Katanine chez *C. elegans*

Les microtubules sont des polymères dynamiques du cytosquelette essentiels à divers processus cellulaires tels que le transport intra-cellulaire, la migration ou la division cellulaire. Parmi les protéines régulatrices de leur dynamique, les « Microtubules Severing Enzymes » (MSE) sont des ATPases qui coupent les microtubules modifiant ainsi leur nombre, leur longueur et leur organisation en réseau. Des défauts d'activité de ces enzymes sont associés à des pathologies humaines, telles que des maladies neurodégénératives ou de l'infertilité masculine.

La famille des MSE comprend la Spastine, la Katanine et la Fidgetine. Leur mécanisme d'action est de plus en plus étudié, cependant le mode de régulation de leur activité n'est pas encore bien connu. Nous utilisons comme modèle la Katanine de *C. elegans*, dont l'activité est essentielle au cours de la méiose femelle pour assurer l'assemblage du fuseau méiotique. Cependant, cette même activité a aussi été décrite comme étant toxique en mitose au cours du développement embryonnaire. Afin de comprendre comment l'activité de la Katanine est régulée/contrôlée durant cette transition méiose-mitose, nous cherchons à déterminer **comment l'enzyme interagit spécifiquement avec son substrat** et **comment la phosphorylation/déphosphorylation de l'enzyme module son activité enzymatique**.

Au cours de ma thèse, j'ai identifié plusieurs motifs d'interaction de la Katanine avec les microtubules *in vitro* dont les mutations modifient drastiquement l'activité de l'enzyme *in vivo*. De plus, j'ai déterminé que plusieurs tubulines sont spécifiquement ciblées par la Katanine pour l'interagir avec le microtubule. Ces résultats démontrent un mode d'interaction enzyme-substrat précis requis pour contrôler l'activité de la Katanine. D'autre part, en développant un outil fonctionnel nous permettant de suivre la localisation de la Katanine dans le ver entier, nous avons, pour la première fois, mis en évidence qu'après une réduction de sa quantité à la transition méiose-mitose, la Katanine reste présente sur les fuseaux mitotiques au cours du développement. Ce résultat inattendu soulève la question du rôle de la Katanine en mitose chez *C. elegans*. Nous avons aussi montré qu'à la transition méiose-mitose, l'activité de la Katanine est contrôlée par phosphorylation à deux niveaux : (i) les phosphorylations de la Katanine inhibent son activité enzymatique et (ii) sont suffisantes à son envoi à la dégradation.

Mon travail de thèse met ainsi en évidence différents modes de régulation de l'activité de la Katanine permettant, à plus long terme et dans un but thérapeutique, de comprendre comment une suractivité enzymatique identifiée dans un contexte pathologique pourrait être contrôlée.

Mots clés : Microtubule Severing Enzyme, interaction enzyme-substrat, *C. elegans*, fuseau méiotique

Thesis abstract

Characterization of functional roles of MEI-1 and MEI-2 subunits in the regulation of Katanin microtubule-severing activity in *C. elegans*

Microtubules are dynamic polymers of the cytoskeleton, essential for diverse cellular events such as intracellular transport, cell division and cell migration. Among regulators of microtubule dynamics is the family of Microtubule-Severing Enzymes (MSE) consisting of ATPases able to sever microtubules in order to modulate their number, length and network organization. Defects in their activity can cause severe human pathologies including neurodegenerative diseases and male infertility.

MSE family comprises three members: Spastin, Fidgetin and Katanin. Their mechanism of action is well studied, but how their activity is regulated is not known. To answer this question, we are using *C. elegans* Katanin, whose activity is essential for meiotic spindle assembly during female meiosis, as a model. Its essential activity for meiosis has been described as toxic for mitosis during embryonic development. In order to understand how Katanin activity is regulated and controlled during the meiosis-mitosis transition, we wanted to determine how Katanin binds specifically its substrate and how Katanin phosphorylation modulates its enzymatic activity.

During my thesis, through combination of *in vitro* and *in vivo* approaches, I have identified two distinct Katanin microtubule-binding domains. Mutations of these domains are modifying Katanin activity. Moreover, I have determined that several tubulins are specifically targeted by Katanin to interact with microtubules. These results demonstrate a precise enzyme-substrate interaction required for Katanin activity during meiosis. By implementing, for the first time, a functional tool allowing us to follow Katanin localization in the whole worm, we have highlighted that even if Katanin levels are drastically reduced during the meiosis-mitosis transition, they remain present in mitosis, specifically on the mitotic spindle during embryonic development. This unexpected result raises the question of Katanin roles during mitosis. We have also shown that during the meiosis-mitosis transition, Katanin activity is controlled by phosphorylation at two levels: (i) phosphorylation of Katanin inhibits its enzymatic activity, and (ii) is sufficient to send Katanin to degradation.

My thesis work contributed to highlight different Katanin modes of regulation allowing us, in the future and in a therapeutic goal, to understand how an over-activity of MSE could be controlled in a pathological context.

Key words: Microtubule Severing Enzyme, microtubule binding, meiotic spindle, *C. elegans*

Table des matières

Remerciements	5
Résumé de la thèse	9
Thesis abstract	11
Table des figures	15
Abréviations	17
Introduction	19
I. Microtubules : structure dynamique du cytosquelette	19
A. Composition du dimère de tubulines	19
B. Organisation et dynamique des microtubules.....	20
C. Fonctions cellulaires du réseau de microtubules	23
II. Microtubules Severing Enzymes : ATPases AAA⁺ régulatrices de la dynamique des microtubules	27
A. Rôles des « Microtubules Severing Enzymes » dans la cellule	27
B. Organisation des « Microtubules Severing Enzymes » & activité ATPase	28
<i>i. Complexe enzymatique hexamérique</i>	28
<i>ii. Particularité de la Katanine : un hexamère de dimères</i>	30
C. Activité de coupure des microtubules par les MSE	33
<i>i. Coupure des microtubules & modification du réseau de microtubules</i>	33
<i>ii. Mécanisme moléculaire de coupure des microtubules</i>	35
D. Interaction des MSE avec les microtubules	38
<i>i. Interaction directe des MSE avec le microtubule</i>	38
<i>ii. Cible des MSE sur le microtubule</i>	40
<i>iii. Interaction indirecte des MSE avec les microtubules</i>	41
III. Les Katanines chez <i>Caenorhabditis elegans</i>	42
A. <i>Caenorhabditis elegans</i> , notre modèle d'étude	42
<i>i. C. elegans : organisme modèle et outil biologique</i>	42
<i>ii. Les MSE chez C. elegans</i>	45
<i>iii. Organisation et dynamique des microtubules au cours des divisions cellulaires chez Caenorhabditis elegans</i>	46
B. Rôle des Katanines chez <i>C. elegans</i>	49
<i>i. Les différentes sous-unités de la Katanine chez C. elegans</i>	49
<i>ii. Une Katanine de C. elegans : complexe MEI-1•MEI-2</i>	50

C.	L'activité de la Katanine ^{MEI-1•MEI-2} est régulée au cours du développement embryonnaire	54
i.	Voie de régulation par le système ubiquitine-protéasome	54
ii.	Voie de régulation par phosphorylation	55
iii.	Lien direct entre la voie de régulation par dégradation et par phosphorylation.....	56
iv.	Voie de régulation par déphosphorylation	56
IV.	Questions et objectifs de la thèse :	59
A.	Régulation de l'activité de la Katanine ^{MEI-1•MEI-2} par phosphorylations	59
B.	Régulation de l'activité de la Katanine ^{MEI-1•MEI-2} via son interaction avec le microtubule	60
Résultats	63
	Phosphorylation of the microtubule-severing AAA+ enzyme Katanin regulates <i>C. elegans</i> embryo development.....	63
	Identification and characterization of microtubule binding domain of Katanin essential for its function in <i>C. elegans</i> female meiosis	89
Discussion et Perspectives	123
1.	Rôle de la Katanine ^{MEI-1•MEI-2} durant la mitose au cours du développement embryonnaire ..	124
2.	Modulation de l'affinité de la Katanine ^{MEI-1•MEI-2} pour les microtubules par les phosphorylations de MEI-2.....	125
3.	Rôle fondamental de la sous-unité régulatrice dans l'interaction productive de la Katanine avec les microtubules	125
4.	Conservation du mode d'interaction de la Katanine avec les microtubules entre espèces...	127
5.	Quelles sont les limites d'un système hétérologue Katanine-microtubules ?.....	127
6.	Résidus de la tubuline ciblés par la Katanine ^{MEI-1•MEI-2} pour interagir avec la surface du microtubule.....	128
7.	Répertoire de Katanines : conservation des domaines fonctionnels et spécificités	129
8.	Régulation de l'activité de la Katanine par compétition avec les MTBD	131
Références bibliographiques	133

Table des figures

Figure 1 : Structure du dimère tubuline α - β	20
Figure 2 : Représentation schématique de la composition du microtubule, des étapes de son assemblage et de sa dynamique.....	21
Figure 3 : Organisation géométrique des protofilaments dans le microtubule.....	22
Figure 4 : Organisation du réseau de microtubules au cours de la division cellulaire.....	24
Figure 5 : Organisation du réseau de microtubules dans une fibre musculaire	25
Figure 6 : Organisation du réseau de microtubules dans des neurones.....	26
Figure 7 : Structure hexamérique des MSE chez <i>C. elegans</i>	29
Figure 8 : Représentation schématique des trois des domaines fonctionnels des Microtubules Severing Enzymes.....	29
Figure 9 : Alignement des séquences des sous-unités p80 de la Katanine chez différentes espèces...32	
Figure 10 : Schéma du mécanisme moléculaire de phototropisme assuré par la Katanine chez <i>Arabidopsis thaliana</i>	34
Figure 11 : Observation de dommages aux microtubules causés par la Katanine <i>in vitro</i>	35
Figure 12 : Schéma du mécanisme d'action des MSE pour générer la coupure du microtubule.....	36
Figure 13 : Représentation schématique du cycle de vie de <i>Caenorhabditis elegans</i>	43
Figure 14 : Représentation schématique de l'organisation d'une gonade de <i>Caenorhabditis elegans</i> ..44	
Figure 15 : Assemblage et dynamique du fuseau méiotique femelle chez <i>Caenorhabditis elegans</i>	47
Figure 16 : Dynamique de la division mitotique d'un embryon précoce chez <i>Caenorhabditis elegans</i> ..49	
Figure 17 : Phénotype des gros globules polaires causés par défauts d'activité de la Katanine ^{MEI-1•MEI-2} au cours de la méiose femelle chez <i>C. elegans</i>	49
Figure 18 : Modèle structural de la sous-unité MEI-2 de la Katanine chez <i>C. elegans</i>	51
Figure 19 : Localisation de MEI-1 sur le fuseau méiotique femelle chez <i>C. elegans</i>	53
Figure 20 : Régulation de l'activité de la Katanine ^{MEI-1•MEI-2} par envoi à la dégradation.....	55
Figure 21 : Représentation schématique des voies de régulation de l'activité de la Katanine ^{MEI-1•MEI-2} à la transition méiose-mitose.....	58
Figure 22 : Exposition à la surface du microtubule des résidus de la tubuline impliqués dans l'interaction Katanine ^{MEI-1•MEI-2} -microtubule.....	126
Figure 23 : Alignement de séquences protéiques des trois sous-unités régulatrices de la Katanine, MEI-2, F47G4.4 et F47G4.5 exprimées chez <i>C. elegans</i>	130

Abréviations

ADP : Adenosine DiPhosphate

APC : Anaphase Promoting Complex

ARNi : Acide Ribonucléique interférent

ARNm : Acide Ribonucléique messenger

ASPM-1 : Abnormal SPindles and primary Microcephaly

ATP : Adenosine TriPhosphate

ATPase AAA⁺ : ATPase Associated with diverse cellular Activities

CAMSAP : CAlModulin-regulated Spectrin-Associated Protein

CDK-1 : Cyclin Dependant Kinase 1

DIC : Contraste Interférentiel Différentiel

DYRK : Dual-specificity tyrosine (Y) phosphorylation-Regulated Kinase

CUL-3 : Cullin 3

EB proteins : End-Binding proteins

EGG3 / EGG4 / EGG5 : EGG sterile 3 / 4 / 5

ESCRTIII : Endosomal Sorting Complex Required for Transport III

GDP : Guanosine DiPhosphate

GFP : Green Fluorescent Protein

GTP : Guanosine TriPhosphate

IPTG : IsoPropyl Thio- β -D-Galactoside

KLP-18 : Kinesin-Like Protein 18

KLP-7 : Kinesin-Like Protein 7

MAPs : Microtubule Associated Proteins

MBK-2 : Mini Brain Kinase 2

MCAK : Mitotic Centromere-Associated Kinase

MEI-1 / MEI-2 : MEiosis defect 1 / 2

MEL-26 : Maternal Effect Lethal 26

MIT : Microtubule Interacting and Trafficking domain

MSE : Microtubule Seaving Enzyme

MSP : Major Sperm Protein

MT : Microtubule(s)

MTBD : Microtubule Binding Domain

MTOC : Microtubule Organizing Center

PP4 : Protein Phosphatase 4

PPFR-1 : Protein Phosphatase Four Regulatory subunit 1

SPAS-1 : *C. elegans* Spastine 1

+TIPs : Microtubule plus-end tracking proteins

-TIPs : Microtubule minus-end tracking proteins

Introduction

Chaque organisme vivant est constitué d'une ou plusieurs cellules. L'architecture de la cellule est assurée par le cytosquelette présent dans son cytoplasme. Il permet de coordonner la forme et les mouvements de la cellule ainsi que ses fonctions cellulaires. Cette structure sous forme de filaments est composée de trois types de polymères dynamiques : les filaments d'actine, les filaments intermédiaires et les microtubules. Nous nous intéressons plus particulièrement au réseau de microtubules et à sa régulation dans la cellule.

I. Microtubules : structure dynamique du cytosquelette

Les microtubules sont des composants du cytosquelette essentiels à l'activité de la cellule. Ils s'organisent sous forme de réseau dynamique pour participer activement à la structure de la cellule et aux fonctions cellulaires essentielles. Le rôle indispensable du réseau de microtubules est retrouvé au cours d'événements et de fonctions cellulaires importants comme par exemple, le transport intracellulaire, la migration, la polarité, et la ségrégation des chromosomes durant la division cellulaire.

A. Composition du dimère de tubulines

Les microtubules sont des polymères de tubulines α et β qui s'assemblent sous forme d'un tube dynamique. Selon les types cellulaires, différentes isoformes de tubulines sont exprimées. Chez l'homme par exemple, neuf isoformes de la tubuline α et neuf de la tubuline β ont été identifiées. Les tubulines sont composées de deux domaines principaux : le corps globulaire de la protéine d'environ 50kDa et un domaine non structuré d'une vingtaine d'acides aminés chargés négativement qui constituent la queue carboxy-terminale de la tubuline (**Figure 1**). Elles s'associent sous forme de dimère α - β pour composer un microtubule dynamique. Chacune des tubulines α et β contient un site d'interaction au GTP. Celui de la tubuline β est exposé alors que le site de la tubuline α se trouve à l'interface entre α et β , celui-ci n'est pas accessible pour l'hydrolyse du GTP (Roll-Mecak, 2020).

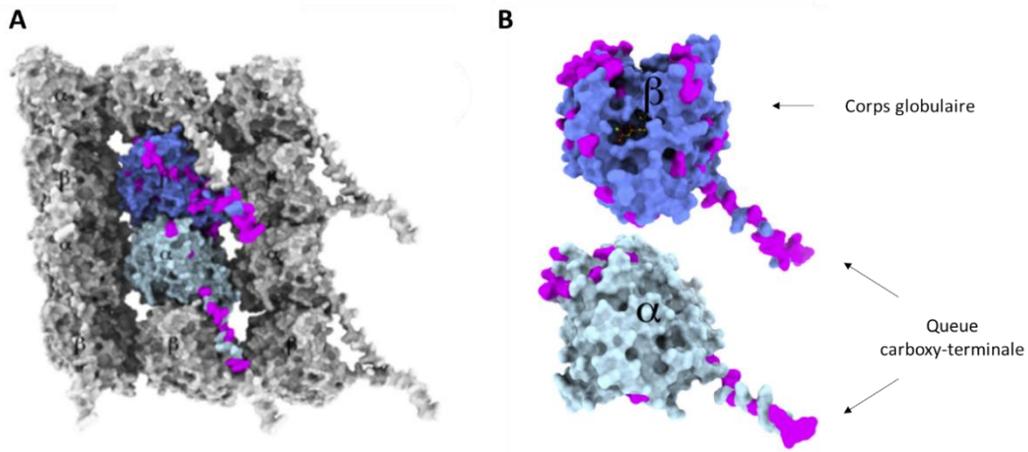


Figure 1 : Structure du dimère tubuline α - β . (A) Vue extérieure de la surface du microtubule. Trois protofilaments composés de dimère de tubulines α et β sont alignés de façon latérale. La tubuline α est colorée en bleu ciel et la tubuline β en bleu foncé. (B) Structure de la tubuline α (bas) et de la tubuline β (haut) composé d'un corps globulaire et d'une queue carboxy-terminale chargée négativement. Figure extraite de la revue Roll-Mecak, 2020.

B. Organisation et dynamique des microtubules

Les dimères de tubulines α - β s'assemblent de façon linéaire « Head-to-tail association » via leur corps globulaire pour générer un protofilament. Plusieurs protofilaments orientés dans le même sens s'associent ensuite pour former un feuillet qui se referme sous forme de tube polarisé (Figures 1 et 2).

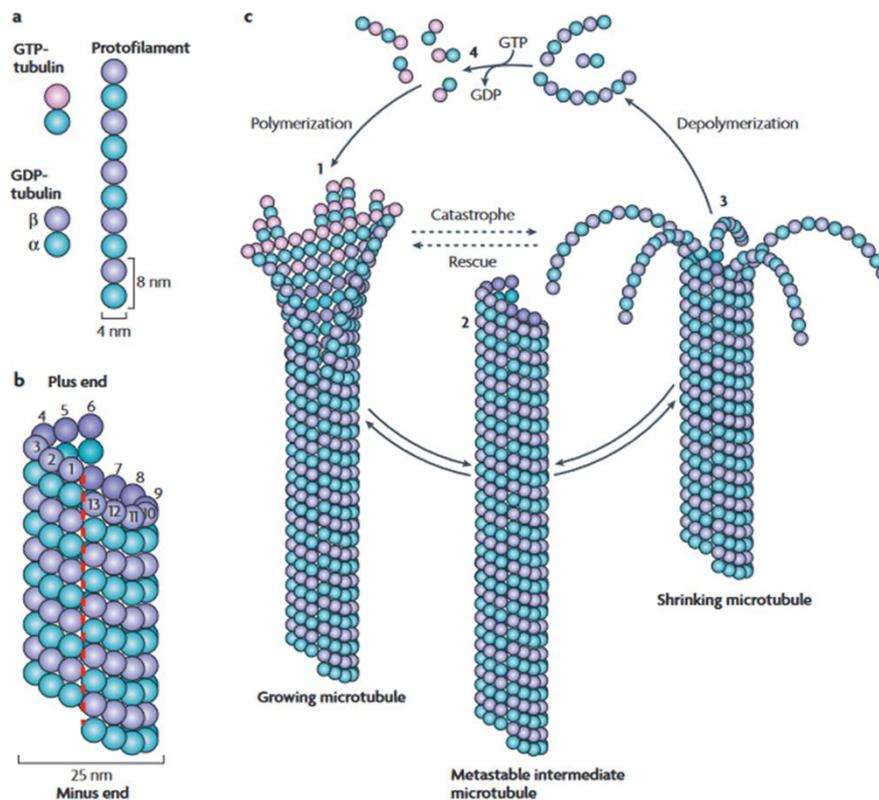


Figure 2 : Représentation schématique de la composition du microtubule, des étapes de son assemblage et de sa dynamique. (a) Représentation d'un dimère de GTP-tubuline α - β , GDP-tubuline α - β et d'un protofilament. (b) Organisation d'un microtubule polarisé formé à partir de 13 protofilaments. (c) Assemblage d'un microtubule à partir de protofilaments s'organisant sous forme d'un feuillet pour se refermer sous forme d'un tube polarisé. Ce tube dynamique oscille entre polymérisation et dépolymérisation. Figure extraite de la revue [Akhmanova and Steinmetz, 2008](#).

Les microtubules les plus couramment observés dans les cellules sont composés de 13 protofilaments. Toutefois, il existe une grande diversité de microtubules dans le monde eucaryote. Le nombre de protofilaments peut varier de 9 à 16 selon les espèces et selon les types cellulaires au sein d'une même espèce ([Chaaban and Brouhard, 2017](#)). Des microtubules de 15 protofilaments ont été identifiés dans les cellules ciliées de l'oreille interne chez la souris ([Chaaban and Brouhard, 2017](#)). Ces microtubules à plus large diamètre sont plus rigides et ont été proposés pour être utiles lors de la mécanotransduction. Cela a aussi été observé dans les neurones sensoriels de chez *C. elegans* alors que ses neurones de la corde ventrale possèdent des microtubules de 11 protofilaments ([Chaaban and Brouhard, 2017](#)). Il a aussi été rapporté que le nombre de protofilaments peut varier dans la même cellule au cours d'un événement cellulaire. Par exemple, durant l'activation des plaquettes dans le sang chez l'humain, les microtubules varient de 13 à 14 et 15 protofilaments ([Chaaban and Brouhard, 2017](#)). La géométrie du microtubule à 13 protofilaments permet une orientation des protomères parallèle à l'axe du microtubule. Alors que les protofilaments d'autres géométries, par exemple, 14

protofilaments, nécessitent de s'enrouler autour de l'axe du microtubule (**Figure 3**) (Chrétien and Wade, 1991). Cela implique des différences d'interactions latérales entre les isoformes des tubulines α et β , mais aussi des différences de domaines des tubulines exposés à la surface du microtubule. Ces observations soulignent la diversité et la complexité de l'organisation des microtubules dans les cellules eucaryotes.

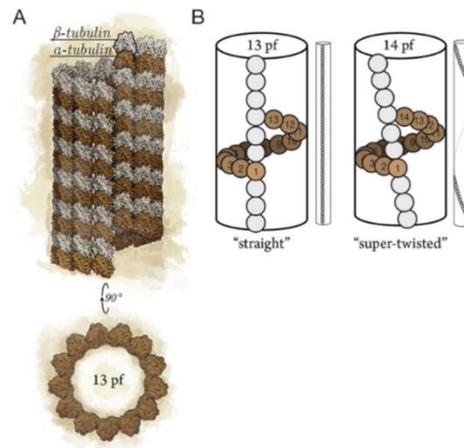


Figure 3 : Organisation géométrique des protofilaments dans le microtubule. (A) Vue latérale et vue supérieure d'un microtubule composé de 13 protofilaments. **(B)** Représentation schématique du pas de décalage de la tubuline. Lorsque que le microtubule est composé de 13 protofilaments, ceux-ci sont organisés de façon parallèle à l'axe du microtubule. Alors que lorsque le microtubule contient 14 protofilaments, ils doivent s'enrouler autour de l'axe du microtubule. Figure extraite de la revue Chaaban and Brouhard, 2017.

Le microtubule est un tube polarisé qui dispose d'une extrémité positive et d'une extrémité négative, selon l'exposition de la tubuline β et la tubuline α respectivement. Le microtubule oscille continuellement entre état de polymérisation et de dépolymérisation (**Figure 2**). Ses deux extrémités sont dynamiques, à la différence près que l'extrémité positive croît et décroît beaucoup plus rapidement que l'extrémité négative. Ces deux phases du cycle de la dynamique du microtubule dépendent de la disponibilité en tubuline libre et en GTP. La présence de dimères de tubulines α - β liés à du GTP stimule la polymérisation des microtubules. A l'inverse, une extrémité non stabilisée qui décroît rapidement est un événement appelé « catastrophe » (**Figure 2**). Lorsque celle-ci est « contrôlée et réparée » par une nouvelle croissance du microtubule, cela est nommé « sauvetage » (**Figure 2**). Ainsi les paramètres les plus couramment utilisés dans la littérature pour analyser la dynamique des microtubules, *in vitro* ou *in vivo*, sont les taux de polymérisation et de dépolymérisation du microtubule, et les fréquences de catastrophes et de sauvetages du microtubule.

Des agents chimiques sont utilisés au laboratoire pour contrôler la dynamique du réseau de microtubules *in vivo* ou *in vitro*. Le taxol et ses dérivés stabilisent les microtubules en bloquant leur

dépolymérisation. La colchicine est utilisée dans le but de bloquer la polymérisation des microtubules. Ces drogues sont extrêmement toxiques pour la cellule, puisqu'elles inhibent toutes les fonctions cellulaires critiques à la vie cellulaire qu'assure le réseau de microtubules comme le maintien structural de la cellule, le transport intracellulaire, la migration ou encore la ségrégation des chromosomes. Ces drogues sont utilisées en première ligne de traitement thérapeutique contre les cancers pour limiter la propagation des cellules cancéreuses.

C. Fonctions cellulaires du réseau de microtubules

Afin de participer activement aux mécanismes cellulaires essentiels à la cellule, les microtubules sont organisés sous forme de réseaux fonctionnels. Plusieurs réseaux de morphologie différente et avec des caractéristiques différentes peuvent coexister dans la même cellule. Selon le contexte cellulaire, différentes protéines de la grande famille des « Microtubules Associated Proteins » (MAPs) contribuent à la régulation de la dynamique et à l'organisation des microtubules.

Dans le but de démontrer l'importance du réseau de microtubules dans la vie et les fonctions de la cellule, voici des exemples de mécanismes cellulaires pour lesquels les microtubules sont indispensables, associés à des exemples d'organisation en réseau des microtubules et des exemples de MAPs qui interviennent dans la régulation de leur dynamique et de leur organisation.

Au cours de la division cellulaire, les microtubules qui composent le fuseau mitotique sont essentiels pour le mouvement et la correcte ségrégation des chromosomes entre deux cellules filles. Un des centres organisateurs de microtubules (MTOC) majoritaire dans la cellule qu'elle soit en interphase ou en mitose, est le centrosome (**Figure 4**). Cette structure cellulaire est composée de deux centrioles, deux cylindres de tubulines organisés de façon orthogonale, entourés du matériel péricentriolaire. Les microtubules émanent du matériel péricentriolaire sous forme radiale pour connecter les chromosomes et le cortex de la cellule par leurs extrémités positives. Les microtubules polymérisent à partir d'anneaux de tubuline γ présents à la surface du centrosome. Le complexe γ -TURC (γ -Tubulin Ring Complex) est un complexe protéique organisé sous forme conique. Il est composé de nombreuses protéines et de 14 tubulines γ qui servent de support pour positionner les dimères de tubulines α - β et initier la croissance du microtubule. Le complexe γ -TURC est un composant extrêmement important pour la cellule puisqu'il contribue à l'organisation des microtubules dans d'autres contextes cellulaires en absence de centrosome (Akhmanova and Kapitein, 2022). Durant la mitose chez les mammifères, EB1 (End-Binding Protein 1) ainsi que ses partenaires présents sur les kinétochores créent et maintiennent les interactions entre les microtubules dynamiques et les chromosomes pour une fidèle ségrégation des chromosomes (Mustyatsa et al., 2017). La famille des

protéines EB (End-Binding) cible l'extrémité positive du microtubule pour recruter des partenaires protéiques et stimuler la polymérisation du microtubule. Les protéines EB interagissent avec les microtubules via leur domaine d'homologie aux calponines (CH domain) qui leur permet de cibler précisément la surface du microtubule entre deux protofilaments au milieu de quatre dimères de tubulines α - β (Martin and Akhmanova, 2018). A l'inverse, pour corriger les erreurs d'interaction entre microtubules et kinétochores, la dépolymérase MCAK (Mitotic Centromere-Associated Kinesin) de la famille des Kinesines-13 cible l'extrémité positive du microtubule pour initier sa dépolymérisation en éliminant des dimères de tubuline (Akhmanova and Steinmetz, 2015; Sanhaji et al., 2011).

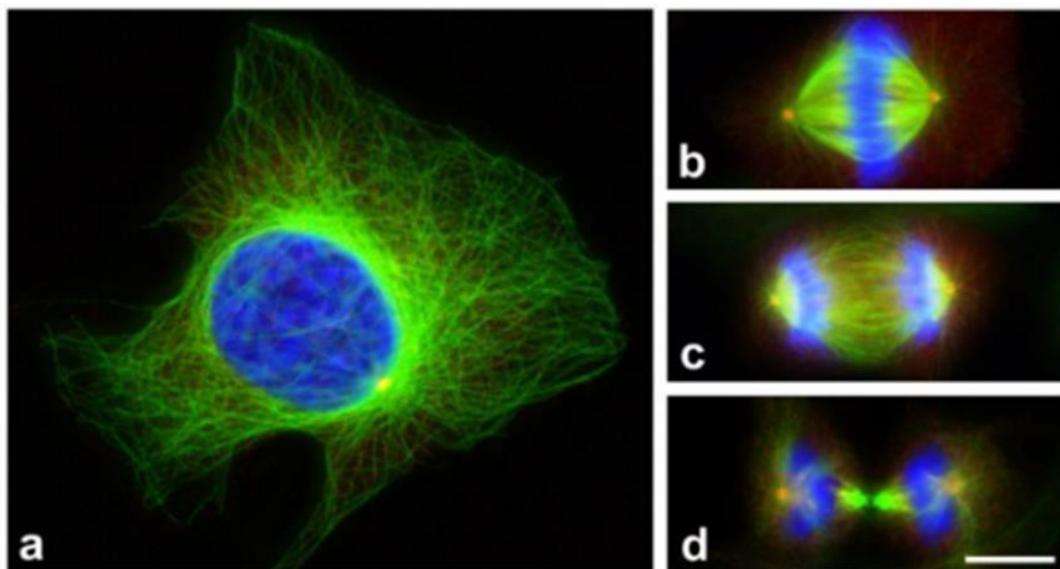


Figure 4 : Organisation du réseau de microtubules au cours de la division cellulaire. Immunomarquage de cellules humaines U2OS fixées en interphase (a), en métaphase (b), en anaphase (c) et en télophase (d) avec un anticorps anti-tubuline (vert) après une coloration au DAPI (bleu). Figure extraite de (Dráber and Dráberová, 2021).

Dans les cellules musculaires, le réseau de microtubules est notamment important pour positionner les noyaux. Les microtubules sont organisés en un réseau parallèle à l'axe longitudinal de la cellule (Figure 5). Il a été observé que dans ces cellules, l'activité du centrosome est atténuée et l'enveloppe nucléaire prend le rôle de MTOC. Le complexe γ -TURC est relié à la membrane nucléaire via la protéine AKAP9. Il permet ainsi la nucléation des microtubules et la stabilisation de leurs extrémités négatives (Akhmanova and Kapitein, 2022; Becker et al., 2020).

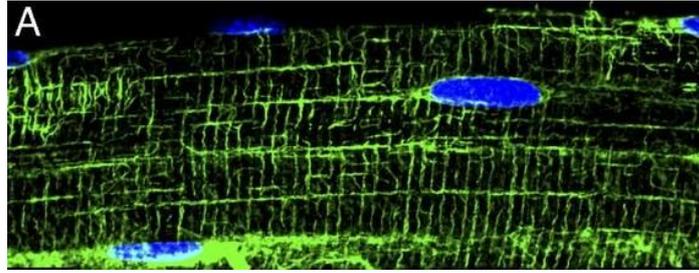


Figure 5 : Organisation du réseau de microtubules dans une fibre musculaire. Immunomarquage de fibre musculaire de souris avec un anticorps anti-tubuline (vert) après une coloration au DAPI (bleu). Figure extraite de (Belanto et al., 2014).

Les microtubules sont essentiels pour maintenir la polarité des cellules épithéliales et la position subcellulaire des organites. Le réseau de microtubules est organisé selon l'axe apico-basal de la cellule, avec les extrémités négatives au pôle apical. Les microtubules sont nucléés à partir de la membrane plasmique. Dans les cellules épithéliales de mammifères, CAMSAP (Calmodulin-regulated Spectrin-Associated Protein) est relié à la membrane plasmique via la Spectraplakine. La famille de protéines CAMSAP a pour fonction de stabiliser l'extrémité négative du microtubule. En bloquant la dynamique de cette extrémité, cela permet de démarrer une nucléation du microtubule et de l'utiliser comme « amorce » pour stimuler la polymérisation du microtubule via l'extrémité positive (Akhmanova and Hoogenraad, 2015; Akhmanova and Kapitein, 2022; Noordstra et al., 2016). Dans d'autres contextes cellulaires, les CAMSAPs reconnaissent les extrémités négatives des microtubules pour les stabiliser et recruter d'autres MAPs spécifiques de l'extrémité négative, appelées les -TIPs (« Microtubule minus-end tracking proteins »). Les CAMSAPs interagissent avec les microtubules, spécifiquement entre deux dimères de tubulines de deux protofilaments différents, via leur domaine CKK et un domaine supplémentaire MBD pour CAMSAP2 et CAMSAP3 (Akhmanova and Steinmetz, 2019).

Les microtubules sont essentiels à la structure et à la fonction des neurones. Dans les axones, les microtubules adoptent une organisation parallèle particulière sous forme de faisceaux (**Figure 6**). Ces faisceaux, appelés « bundles », maintiennent la structure de l'axone, favorisent l'élongation de l'axone et facilitent le transport intracellulaire de cargos. Les faisceaux de microtubules sont des alignements antiparallèles de microtubules générant un large groupe de microtubules dynamiques. Certaines MAPs, comme Tau, favorisent la formation de faisceaux en formant des liens transversaux entre les microtubules dans les neurones. La protéine Tau se dimérise et interagit avec la surface de chacun des deux microtubules pour les stabiliser et former des cross-links entre ces microtubules. Les moteurs moléculaires, tels que la Kinesine-1 participent aussi activement à la formation de bundles. Ces enzymes forment des cross-links de microtubules et grâce à leur mouvement sur la surface de l'un

des deux microtubules, permet de faire glisser un microtubule sur le second. Ce mécanisme permet, par exemple, le transport de longs microtubules vers l'extrémité de l'axone nécessaires pour son élongation (Akhmanova and Kapitein, 2022; Akhmanova and Steinmetz, 2015). Ce mécanisme est aussi retrouvé au niveau du fuseau mitotique central au cours de l'anaphase. Les protéines de la famille MAP65/PRC1 se coordonnent avec les protéines de la famille des Kinesine-4 et Kinesine-5 pour former des faisceaux de microtubules et faire glisser les microtubules de façon antiparallèle. PRC1 contient un domaine d'interaction aux microtubules (Spectrin domain) qui reconnaît un dimère de tubulines et un second domaine qui régule spécifiquement cette interaction (Walczak and Shaw, 2010).

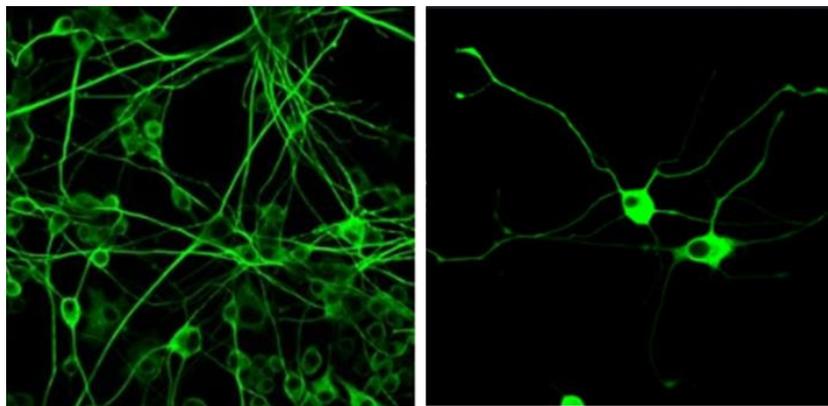


Figure 6 : Organisation du réseau de microtubules dans des neurones. Immunomarcage de cellules PC12 de rat avec un anticorps anti-tubuline β . Figure extraite du site abcam.com.

Le réseau de microtubules est aussi un support aux moteurs moléculaires pour le transport intracellulaire qui est essentiel au fonctionnement de la cellule. Les microtubules sont des rails pour les moteurs moléculaires. Les moteurs moléculaires sont des enzymes qui vont utiliser l'hydrolyse de l'ATP pour se déplacer sur la surface du microtubule. Les Kinesines se déplacent de l'extrémité négative vers l'extrémité positive du microtubule, appelé le transport antérograde. Dans un neurone, ce transport se fera du corps cellulaire vers l'axone. A l'inverse les dynéines se déplacent de façon rétrograde, de l'extrémité positive vers l'extrémité négative du microtubule. Ces moteurs moléculaires sont composés d'un domaine moteur qui permet l'hydrolyse de l'ATP et l'interaction avec la surface du microtubule. Le second domaine qui est plus variable permet l'interaction avec des partenaires pour le support de cargos.

Il est aussi possible que les microtubules polymérisent à partir d'une nucléation spontanée et autonome de dimères de tubulines α - β si leur concentration est assez haute. Les dimères s'associent alors sous forme d'oligomères pour former un microtubule (Akhmanova and Kapitein, 2022). C'est

notamment le mode de polymérisation de microtubules utilisé *in vitro* dans les laboratoires à partir de tubulines purifiées.

En plus de réguler la dynamique des microtubules dans la cellule, certaines MAPs modifient la nature des microtubules en ajoutant des modifications post-traductionnelles sur les tubulines. Ces modifications sont positionnées sur le corps globulaire de la tubuline ou sur la queue carboxy-terminale. La détyrosination et la déglutamylation sont retrouvées uniquement sur la tubuline α , alors que la méthylation, la polyglutamylation, l'acétylation ou la phosphorylation sont identifiées sur les tubulines α et β (Roll-Mecak, 2020). L'ajout ou l'élimination de ces modifications a pour but de moduler l'activité d'autres MAPs sur ce microtubule (Bodakuntla et al., 2021; Janke and Magiera, 2020; Roll-Mecak, 2020). Par exemple, lorsque le microtubule subit une détyrosination complète au cours de la mitose, il devient insensible à l'activité de dépolymérisation par MCAK, ce qui conduit à des défaut de ségrégation des chromosomes (Janke and Magiera, 2020). Dans les neurones chez la souris, la polyglutamylation des microtubules permet une meilleure interaction productive des moteurs moléculaires tels que les Kinesine-1, Kinesine-2 et Kinesine-3, avec le microtubule (Bodakuntla et al., 2021; Roll-Mecak, 2020).

Au sein des régulateurs de la dynamique et de l'organisation du réseau de microtubules, il existe une autre famille d'enzymes extrêmement importantes pour le fonctionnement de la cellule. Les « Microtubules Severing Enzymes » agissent comme des ciseaux moléculaires pour contrôler les microtubules dans l'espace dans de nombreux événements cellulaires.

II. Microtubules Severing Enzymes : ATPases AAA⁺ régulatrices de la dynamique des microtubules

A. Rôles des « Microtubules Severing Enzymes » dans la cellule

Les « Microtubules Severing Enzymes » (MSE) sont des enzymes qui ont pour fonction de couper les microtubules. Elles participent ainsi à une réorganisation rapide du réseau de microtubules essentiel à l'événement cellulaire dans lequel elles interviennent. Les MSE regroupent trois sous-familles d'enzymes : la Spastine, la Fidgetine et la Katanine. Ces enzymes sont conservées entre les espèces eucaryotes. Elles sont retrouvées chez des organismes très divers, tels que des organismes unicellulaires comme *Chlamydomonas reinhardtii*, *Tetrahymena thermophila*, des plantes (*Arabidopsis thaliana*), des nématodes (*Caenorhabditis elegans*), des insectes (*Drosophila melanogaster*), ou encore, des vertébrés comme *Xenopus laevis* et les mammifères.

Même si les MSE partagent la même activité enzymatique, plusieurs MSE peuvent être exprimées dans un même organisme. Les mécanismes cellulaires dans lesquels elles sont impliquées peuvent être très variables d'un organisme à l'autre, ou d'une MSE à l'autre. Par exemples, la Spastine est importante pour le développement neuronal (Liu et al., 2021), la Katanine est essentielle à la formation de cils et des flagelles (Lohret et al., 1998; Sharma et al., 2007), et la Fidgetine est requise pour la division mitotique (Mukherjee et al., 2012).

L'importance de leurs activités dans la fonction d'une cellule est mise en évidence par l'existence de nombreuses pathologies humaines causées par des mutations affectant l'expression ou l'activité de la protéine. Par exemple, la paraplégie spastique héréditaire est une maladie neuronale issue d'un défaut d'activité de la Spastine (Hazan et al., 1999). Une surexpression de la Katanine est mesurée dans de nombreux cancers tels que le cancer du sein (Fu et al., 2018), de la prostate (Ye et al., 2013; Zheng et al., 2019), de la thyroïde (Chen et al., 2020) ou des poumons (Ye et al., 2020). Cette surexpression a aussi été décrite comme biomarqueur de métastases de certains cancers (Ye et al., 2013; Li et al., 2018; Wang et al., 2020). Des maladies cardiovasculaires (Furtado et al., 2017), des malformations cérébrales (Mishra-Gorur et al., 2014; Yigit et al., 2016), ainsi que de la stérilité masculine (Smith et al., 2012; O'Donnell et al., 2014) ont également été associées à une dérégulation de l'activité de la Katanine. Enfin, un dysfonctionnement de la Fidgetine peut entraîner des troubles neurologiques (Cox et al., 2000), ou être impliqué dans le cancer du foie (Zhou et al., 2020).

B. Organisation des « Microtubules Severing Enzymes » & activité ATPase

i. Complexe enzymatique hexamérique

Les « Microtubules Severing Enzymes » (MSE) sont des ATPases AAA⁺ (ATPase Associated with diverse cellular Activities). Ces enzymes utilisent l'énergie générée par l'hydrolyse de l'ATP pour remodeler leur substrat. Dans le cas des MSE, le substrat est le microtubule.

Les MSE s'assemblent sous forme d'hexamère pour assurer leurs activités d'hydrolyse de l'ATP et de coupure des microtubules (**Figure 7**). En effet, chaque monomère est constitué d'un domaine AAA caractéristique des ATPases AAA (**Figure 8**) (Seraphim and Houry, 2020). Lors de l'hexamérisation des monomères, le rapprochement des domaines AAA deux à deux conduit à la reconstitution d'une « poche » d'interaction et d'hydrolyse de l'ATP via les domaines Walker A et Walker B. Cette organisation sous forme d'hexamère assurant l'activité ATPase est strictement requise pour la coupure des microtubules. Différentes études structurales récentes ont révélé la structure de la Spastine (Han et al., 2020; Roll-Mecak and Vale, 2008; Sandate et al., 2019) et de la Katanine (Faltova et al., 2019; Nithianantham et al., 2018; Rezabkova et al., 2017; Zehr et al., 2017; Zehr et al., 2020). Les six domaines

AAA organisés en hexamère forment le pore central (**Figure 7**). Trois boucles essentielles à l'activité de coupure des microtubules sont exposées au milieu de ce pore. Les acides aminés qui composent ces boucles sont chargés positivement. Tandis que le microtubule est chargé négativement due aux queues carboxy-terminales des tubulines exposées à sa surface.

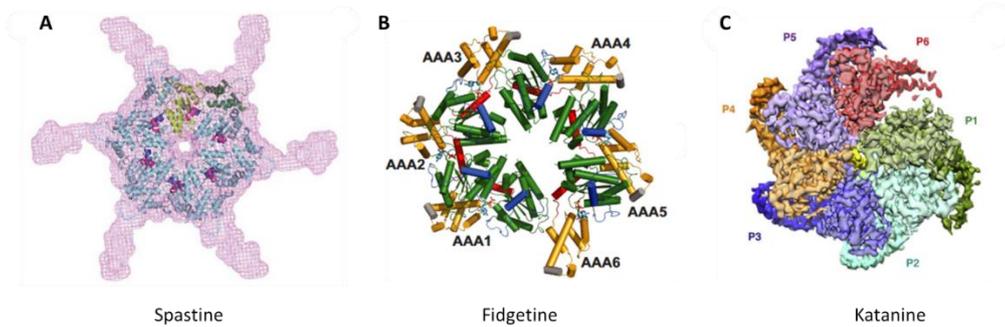


Figure 7 : Structure hexamérique des MSE chez *C. elegans*. (A) Reconstitution par SAXS de la structure du domaine MIT et AAA de la Spastine de *C. elegans* (Roll-Mecak and Vale, 2008). (B) Structure cristalline du domaine AAA de la Fidgetine-like 1 de *C. elegans* (Peng et al., 2013). (C) Structure par cryo-microscopie électronique d'un fragment de la sous-unité catalytique MEI-1 de la Katanine chez *C. elegans* (Zehr et al., 2020).

Le second domaine qui est conservé entre les MSE est le domaine MIT (Microtubules Interacting and Trafficking) composé d'une succession de trois hélices (**Figure 8**). Malgré son nom, ce domaine ne permet pas l'interaction directe de l'enzyme avec les microtubules. Il assure l'interaction de l'enzyme avec d'autres partenaires protéiques (Roll-Mecak and McNally, 2010). Par exemple, la Spastine interagit avec CHM1B, une protéine ESCRTIII, via ce domaine pour être localisée sur le corps central lors de la cytokinèse.

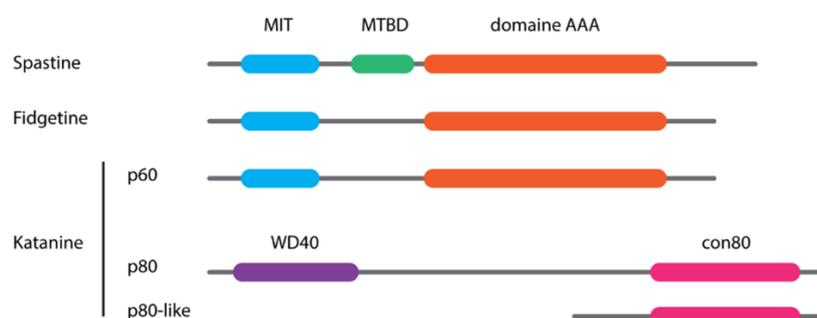


Figure 8 : Représentation schématique des trois domaines fonctionnels des Microtubules Severing Enzymes. La Spastine, la Fidgetine et la sous-unité catalytique p60 de la Katanine contiennent un domaine AAA (ATPase Associated with diverse cellular Activities) et un domaine MIT (Microtubule Interacting and Trafficking). La Spastine contient un domaine MTBD (Microtubules Binding Domain). Il existe deux types de sous-unités régulatrices de la Katanine : p80 et p80-like. La sous-unité p80 contient un domaine WD40 et un domaine con80 retrouvé chez la sous-unité p80-like.

ii. Particularité de la Katanine : un hexamère de dimères

La première de ces trois enzymes à avoir été purifiée a été la Katanine de l'oursin (McNally and Vale, 1993). La Katanine se distingue des autres MSE par son organisation sous forme d'hexamère de dimères (Figure 8). En effet, cette enzyme se compose de deux sous-unités, une sous-unité catalytique et une sous-unité régulatrice, alors que les autres MSE n'en possèdent qu'une seule. La sous-unité catalytique, appelée p60, contient le domaine AAA conservé avec le monomère de la Spastine et de la Fidgetine (Figure 8). Ce domaine est responsable de l'hexamérisation du complexe et de l'activité d'hydrolyse de l'ATP. La sous-unité p60 interagit avec p80 via son domaine N-terminal (McNally and McNally, 2011; Jiang et al., 2017).

La sous-unité régulatrice p80 a pendant longtemps été considérée comme « accessoire ». Pourtant aujourd'hui, les données de la littérature suggèrent que cette sous-unité a des fonctions critiques. La sous-unité p80 stabilise l'hexamère de la Katanine (Joly et al., 2016). A ce jour, une seule étude démontre sa fonction essentielle d'interaction directe avec les microtubules (Joly et al., 2016). Cependant, McNally and McNally (2011) affirment que l'interaction de la Katanine avec les microtubules est assurée par la partie N-terminale de p60. Seulement, dans leur étude les auteurs co-expriment p60 et p80 de *C. elegans* dans des cellules en culture de Xénope pour analyser la co-localisation de p60 avec les microtubules. Ils ne prennent pas en compte la présence de la sous-unité p80 pour justifier la co-localisation de p60 avec les microtubules. Même si certaines sous-unités p60, telles que p60 chez l'oursin ou KATNAL2 chez l'homme sont suffisantes pour couper les microtubules, la présence de leur sous-unité p80 permet d'augmenter considérablement leur interaction avec les microtubules (McNally and McNally, 2011; McNally et al., 2000).

La sous-unité régulatrice est aussi requise pour localiser la Katanine aux centrosomes au cours de la mitose (Hartman et al., 1998; McNally et al., 2000; Mishra-Gorur et al., 2014). Elle est composée de deux domaines caractéristiques : le domaine WD40 et le domaine con80 (Figure 8). Le domaine WD40 localisé en N-terminal de la protéine est une répétition de motifs organisés en feuillets β assemblés sous forme circulaire, connue pour interagir avec des partenaires protéiques (Schapira et al., 2017). Une mutation ponctuelle de ce domaine conservé conduit chez la souris à une stérilité masculine causée par de multiples défauts au cours de la spermatogenèse tels que la dynamique du fuseau méiotique, le développement du flagelle, la structure de la cellule (O'Donnell et al., 2012).

Certaines sous-unités régulatrices sont appelées p80-like, car elles ne contiennent pas de domaine WD40 mais seulement la partie carboxy-terminale des p80 (exemple : KATNBL1 chez l'humain) où se trouve le domaine con80 (Figure 8). Il assure en particulier l'interaction des sous-unités p60:p80 (Hartman et al., 1998; McNally et al., 2000; Srayko et al., 2000). Le fait que les sous-unité p80-like

interagissent directement avec les MT suggère fortement que le domaine con80 contient aussi le domaine d'interaction aux microtubules de la sous-unité régulatrice (McNally et al., 2000; McNally and McNally, 2011; Joly et al., 2016).

Les sous-unités p80 et p80-like possèdent dans leur domaine con80 un motif extrêmement conservé entre les espèces (**Figure 9**). La quasi stricte conservation de ces résidus suggère un rôle essentiel de ce motif dans l'activité du complexe enzymatique. Plusieurs hypothèses peuvent être proposées quant au rôle de ce motif : (i) motif d'interaction avec la sous-unité catalytique, (ii) motif d'interaction avec les microtubules, (iii) motif d'interaction avec un partenaire protéique permettant une localisation spécifique de la Katanine *in vivo*. Il a été décrit chez la souris que la surexpression de mutants de ce motif dans des cellules modifient la localisation de la Katanine aux extrémités des microtubules (Jiang et al., 2017).

Selon les espèces, plusieurs sous-unités catalytiques et régulatrices peuvent être exprimées dans le même organisme (Roll-Mecak and McNally, 2010). Chez l'humain par exemple, il existe 3 sous-unités catalytiques KATNA1, KATNAL1 et KATNAL2 ainsi que deux sous-unités régulatrices KATNB1 et KATNBL1 qui peuvent s'assembler pour former différents types d'hexamères. Il a été montré que KATNA1 interagit avec KATNB1 et KATNBL1, que KATNAL1 interagit avec KATNB1 et KATBL1, et que KATNAL1 interagit avec KATNB1 lorsque les sous-unités sont co-exprimées dans des cellules humaines en culture (Cheung et al., 2016; Dunleavy et al., 2017). La probable coexistence de plusieurs Katanines dans un organisme donné suggère que chaque Katanine a une spécificité : une activité de coupure de microtubules plus élevée due à une affinité accrue de l'enzyme pour le substrat ou une activité ATPase supérieure, une spécificité tissulaire/cellulaire, une cible différente sur son substrat, ou encore un partenaire protéique spécifique.

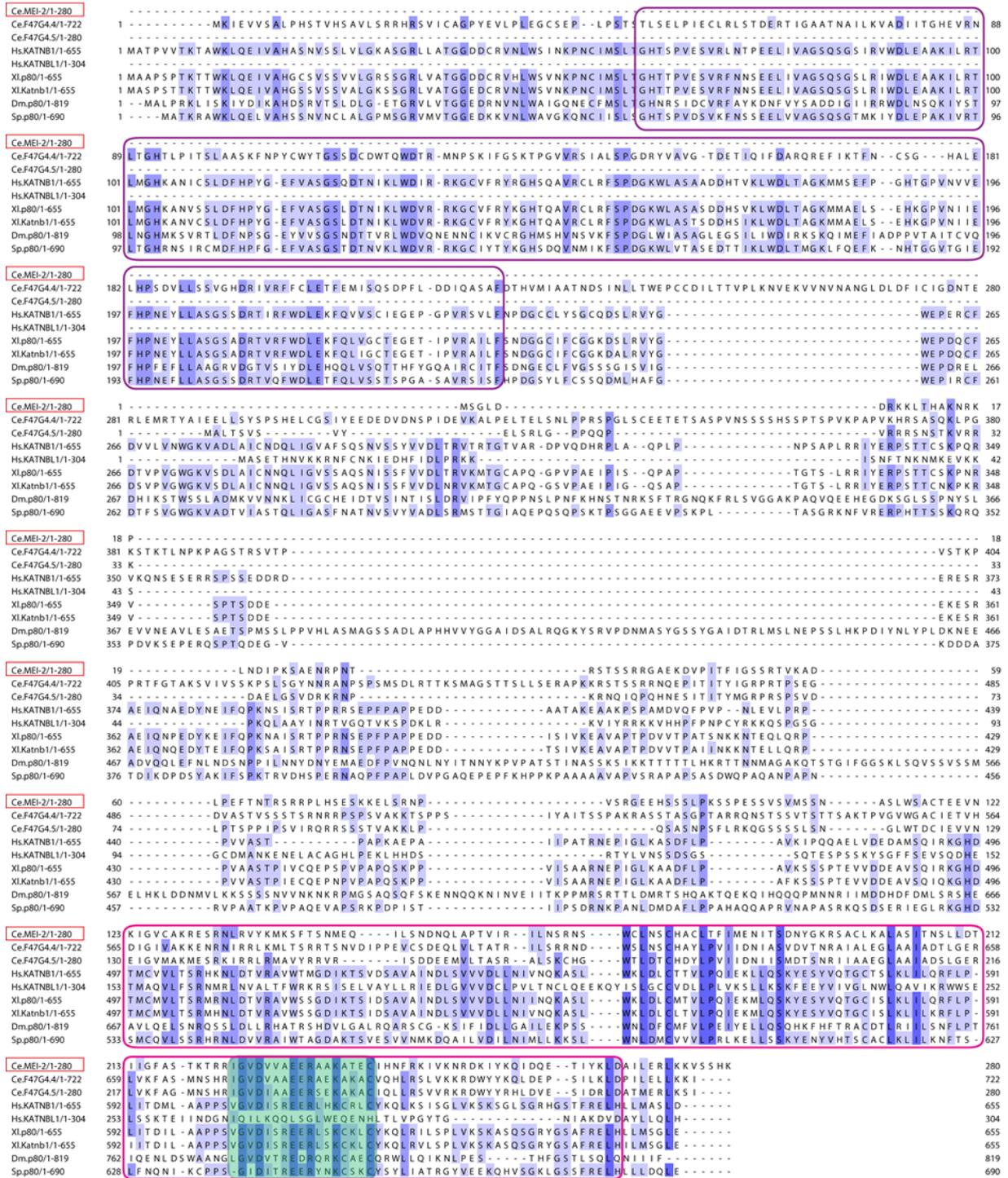


Figure 9 : Alignement des séquences des sous-unités p80 de la Katanine chez différentes espèces. *Ce* : *Caenorhabditis elegans* ; *Hs* : *Homo sapiens* ; *Mm* : *Mus musculus* ; *Xl* : *Xenopus laevis* ; *Dm* : *Drosophila melanogaster* ; *Sp* : *Strongylocentrotus purpuratus* (oursin). Le code couleur bleu représente la conservation des résidus entre les espèces ; plus le bleu est foncé, plus le résidu est conservé. Le domaine WD40 des p80 est encadré en violet et le domaine con80 est encadré en rose. La région d'intérêt strictement conservée entre les p80 est surlignée en vert.

C. Activité de coupure des microtubules par les MSE

i. *Coupure des microtubules & modification du réseau de microtubules*

L'activité de coupure des microtubules a été rapportée pour la première fois à partir d'extraits embryonnaires mitotiques de xénope. L'ajout de ces extraits à des microtubules fluorescents polymérisés *in vitro*, entraîne leur coupure et leur dépolymérisation (Vale, 1991). Une fois, les MSE identifiée chez d'autres espèces (McNally and Vale, 1993; Clark-Maguire and Mains, 1994a; Clark-Maguire and Mains, 1994b), il a été démontré quelques années plus tard que cette activité de coupure des microtubules dans les extraits embryonnaires mitotiques de xénope est assurée par la Katanine, qui est essentielle à la réorganisation du réseau de microtubules au cours de la mitose (McNally and Thomas, 1998).

Il a d'abord été décrit que cette coupure du microtubule par les MSE génère de nouvelles extrémités du microtubule non stables qui causent la dépolymérisation de celui-ci (Matsushita-Ishiodori et al., 2007; Mukherjee et al., 2012; Zhang et al., 2007; Zhang et al., 2011), ce qui semble être un mécanisme efficace pour déstructurer rapidement un réseau de microtubules. En effet, c'est ce qui est observé lorsque les enzymes sont surexprimées dans des cellules. L'analyse de cette observation doit être modérée car dans ce cas, le ratio de la quantité d'enzyme active sur la quantité de microtubules dans la cellule est bien supérieur que dans une condition physiologique. Cela implique une suractivité de l'enzyme sur le réseau de microtubule. La quantité de tubuline-GTP disponible n'étant pas suffisante pour réparer le microtubule et « contrer » l'activité de l'enzyme. Cela entraîne plus de coupures sur le même microtubule et donc des conséquences plus importantes sur la stabilité de celui-ci.

Cependant, de nouvelles études démontrent que dans le cas où une concentration physiologique en tubuline libre est ajoutée au système *in vitro*, l'activité de la Katanine ou de la Spastine amplifie le nombre de microtubules au cours du temps (Vemu et al., 2018; Kuo et al., 2019). Ces fragments de microtubules coupés qui possèdent de nouvelles extrémités dynamiques, peuvent croître en utilisant de la tubuline libre disponible, ayant pour conséquence une augmentation du nombre de microtubules dans l'espace. Cette observation a aussi été faite *in vivo*, par exemple au cours de l'assemblage du fuseau méiotique femelle chez *C. elegans* (McNally et al., 2006; Roll-Mecak and Vale, 2006; Srayko et al., 2006). Dans le cas où la tubuline libre est largement en excès par rapport à l'activité de coupure des microtubules par les MSE, la formation d'îlots de GTP-tubuline est observée là où le microtubule a été endommagé par la MSE, correspondant à une réparation spontanée du microtubule (Vemu et al., 2018). Un équilibre peut ainsi s'installer entre la coupure des microtubules par les MSE et la polymérisation de microtubules à partir des fragments générés, permettant un

contrôle et une limitation de la croissance de ces « nouveaux » microtubules. C'est ce qui est en particulier observé au cours de la division mitotique chez *Xenopus tropicallis* et *Xenopus laevis* (Loughlin et al., 2011) et lors de la division méiotique chez *C. elegans* (McNally et al., 2006). Des mutations de la Katanine causant une réduction de son activité dans chacun des systèmes, montrent un allongement de la taille des fuseaux. Les MSE sont alors capables de contrôler le nombre et la longueur des microtubules permettant une organisation précise du réseau de microtubules.

C'est ainsi en modulant la dynamique d'assemblage et de désassemblage des microtubules, en augmentant le nombre de microtubules disponibles dans l'espace et en contrôlant leur longueur, que les MSE sont capables de réorganiser un réseau de microtubules de façon rapide et efficace. Il existe un exemple d'une réorganisation spectaculaire du réseau de microtubules par la Katanine, dans les cellules de la tige de *Arabidopsis thaliana* (Figure 10). Après exposition à la lumière bleue, l'enzyme se localise précisément à un croisement entre deux microtubules afin de les couper. Cela entraîne la nucléation de nouveaux microtubules pour modifier leur orientation de façon perpendiculaire à l'axe de la racine. Ce mécanisme moléculaire illustre précisément le phototropisme chez *Arabidopsis thaliana* permettant une courbure de la tige en réponse à la lumière (Lindeboom et al., 2013).

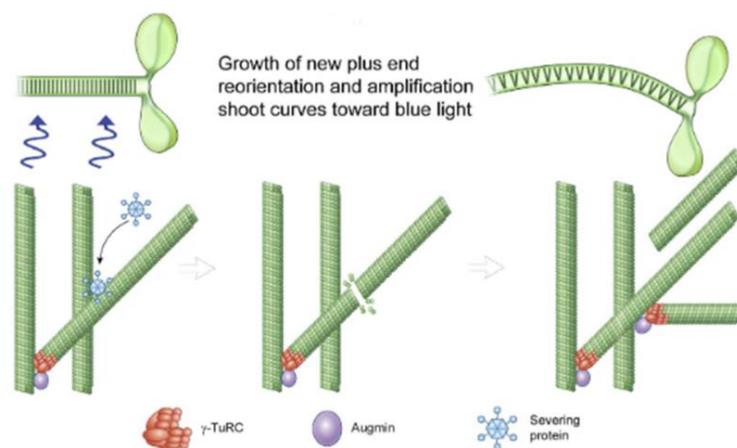


Figure 10 : Schéma du mécanisme moléculaire de phototropisme assuré par la Katanine chez *Arabidopsis thaliana*. Après exposition des cellules de la tige (hypocotyle) de *Arabidopsis thaliana* à une lumière bleue, la Katanine reconnaît un croisement de microtubules. L'enzyme coupe le microtubule pour entraîner la nucléation de nouveaux microtubules à l'aide du complexe γ -TuRC. Cela permet une modification rapide de l'orientation des microtubules en réponse à la lumière. Figure extraite de la revue McNally and Roll-Mecak 2018, basée sur l'étude de Lindeboom et al., 2013.

Les MSE ne sont donc pas seulement requises pour couper et déstructurer le réseau de microtubules mais elles sont aussi des actrices majeures de la régulation de la dynamique

d'assemblage et/ou de réorganisation en réseau des microtubules. *Mais quels sont les mécanismes moléculaires utilisés par l'enzyme pour générer cette coupure du microtubule ?*

ii. Mécanisme moléculaire de coupure des microtubules

Les conséquences biologiques de l'action des MSE sur le réseau de microtubules ont largement été observées depuis de nombreuses années, cependant les mécanismes moléculaires mis en place pour modifier le réseau de microtubules sont plus difficiles à étudier.

Les MSE génèrent des dommages à la surface du microtubule conduisant à une fragilisation du microtubule et à sa cassure. Ces dommages au microtubule causés par la Spastine ont été observés *in vitro* par microscopie électronique (Figure 11) (Vemu et al., 2018) et ceux causés par la Katanine ont été observés *in vivo* par tomographie électronique sur un fuseau méiotique d'ovocyte de *C. elegans* (Srayko et al., 2006).

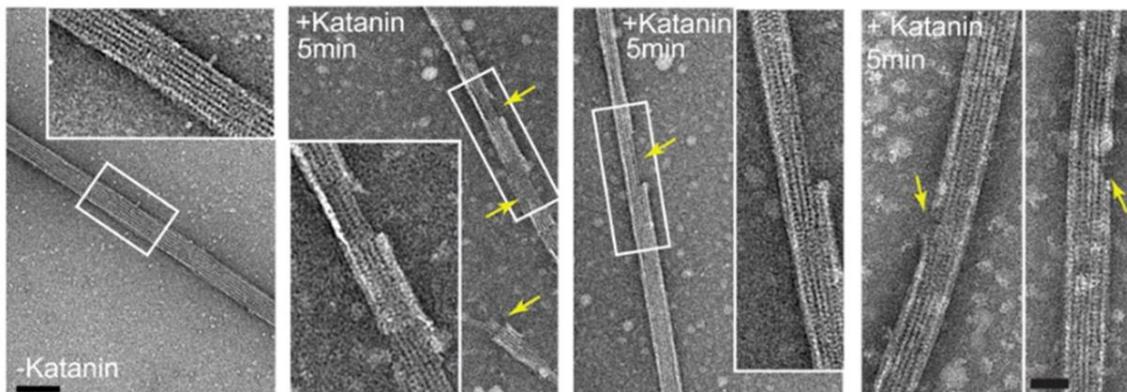


Figure 11 : Observation de dommages aux microtubules causés par la Katanine *in vitro*. Images de microscopie électronique à transmission des dommages causés par la Katanine sur le microtubule. Les flèches jaunes indiquent les cassures du microtubule. Figure extraite de Vemu et al., 2018.

Le mécanisme moléculaire conduisant à ces dommages est complexe. Dans la littérature, de nombreux éléments du mécanisme général ont été démontrés mais aussi de nombreuses suggestions ont été proposées pour illustrer ce mécanisme d'action. Dans la suite de ce manuscrit, nous essayons de mettre en lumière ce qui est clairement démontré et ce qu'il reste à déchiffrer.

Les MSE nécessitent d'être oligomérisées sous forme d'hexamère pour être actives et couper les microtubules. Sandate et al., (2019) proposent que l'oligomérisation de la Spastine est facilitée par l'interaction des monomères avec la surface du microtubule. Pourtant, deux autres études réalisées

chez *C. elegans* démontrent que la Spastine et la Katanine s'assemblent sous forme d'hexamères fonctionnels en absence de microtubules et sont capables d'hydrolyser l'ATP (Matsushita-Ishiodori et al., 2009; Joly et al., 2016). L'interaction de la MSE avec son substrat n'est donc pas requise pour l'oligomérisation du complexe.

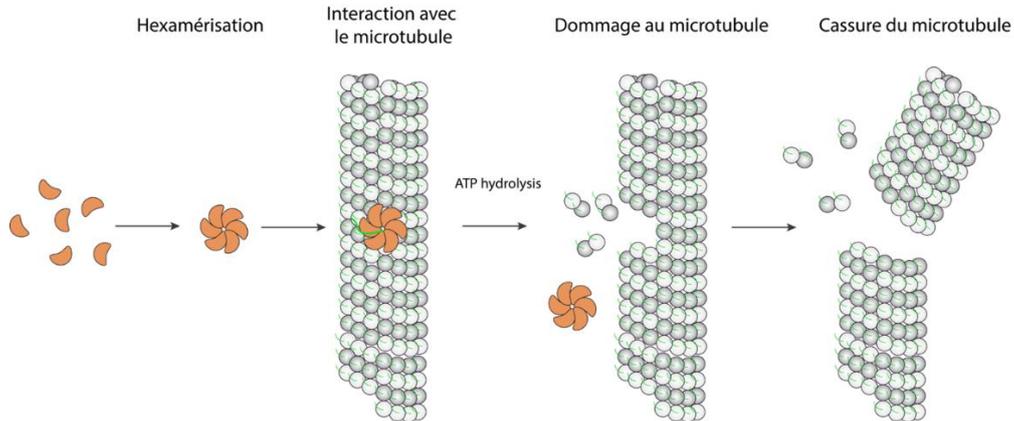


Figure 12 : Schéma du mécanisme d'action des MSE pour générer la coupure du microtubule. La MSE s'oligomérisse sous forme d'hexamère puis interagit avec la surface du microtubule. La queue carboxy-terminale d'une tubuline est insérée dans le pore centrale. A l'aide de son activité d'hydrolyse de l'ATP, l'enzyme génère un dommage au microtubule. Ces dommages déstabilisent le microtubule et entraîne sa cassure.

La MSE interagit à la surface du microtubule pour générer le dommage (**Figure 12**). Néanmoins, le mode d'interaction entre l'enzyme et la surface du microtubule n'est pas si simple à étudier. Cela implique d'analyser le(s) domaine(s) d'interaction précis de l'enzyme et les cibles reconnues sur le microtubule. Plusieurs analyses structurales ont mis en évidence l'interaction directe du pore central de l'hexamère et d'un peptide mimant la queue carboxy-terminale de la tubuline. Les résidus chargés négativement du peptide sont en interaction directe avec les résidus chargés positivement des boucles (loop 1 et loop 2) du pore central (White et al., 2007; Johjima et al., 2015; Sandate et al., 2019; Han et al., 2020; Zehr et al., 2020). Par ailleurs, de nombreuses études démontrent que l'activité de coupure des microtubules est strictement dépendante de la présence des queues carboxy-terminales de la tubuline. Lorsque celles-ci sont éliminées du microtubule par digestion enzymatique par la subtilisine qui cible spécifiquement ces queues, l'activité de coupure des microtubules est largement réduite (McNally and Vale, 1993; Roll-Mecak and Vale, 2005; Bailey et al., 2015; Johjima et al., 2015; Zehr et al., 2020). Cependant, concernant l'interaction directe de la MSE avec le microtubule, les données de la littérature ne suivent pas toutes la même hypothèse. Certaines études ne distinguent pas d'effet de l'absence de queues carboxy-terminales sur l'interaction directe entre l'enzyme avec les microtubules (McNally and Vale, 1993; Belonogov et al., 2019), suggérant que l'enzyme interagit avec le microtubule

avant d'intégrer la queue carboxy-terminale de la tubuline dans le pore central. Alors que d'autres études démontrent l'inverse : la queue carboxy-terminale est essentielle à l'interaction enzyme-substrat, elle-même requise pour l'activité de coupure des microtubules (Eckert et al., 2012; Bailey et al., 2015; Valenstein and Roll-Mecak, 2016; Zehr et al., 2020).

Il est donc proposé qu'une fois l'enzyme proche de la surface du microtubule, la queue carboxy-terminale d'une tubuline serait insérée dans le pore central de l'hexamère (**Figure 12**). L'activité d'hydrolyse de l'ATP par l'hexamère génèrerait une force de traction permettant un mouvement des boucles du pore qui vont interagir avec les résidus suivants de la tubuline pour extraire la tubuline du microtubule. Ce mécanisme d'action, nommé « hand over hand », a été étudié *in vitro*. La force nécessaire et suffisante à l'extraction de la tubuline est décrite comme compatible avec celle générée par les MSE (Han et al., 2020; Kuo et al., 2022).

De nombreuses études *in vitro* ont mis en évidence que la présence de microtubules stimule l'activité d'hydrolyse de l'ATP des MSE (McNally and Vale, 1993; Matsushita-Ishiodori et al., 2009; Johjima et al., 2015; Joly et al., 2016). Cela pourrait être une étape essentielle de ce mécanisme permettant une extraction efficace de la tubuline à partir du microtubule, mais cela reste à être démontré. Il est également proposé que cette extraction de la tubuline du microtubule soit associée à une dénaturation (« unfolding »), au moins partielle, de la tubuline via le pore central de la MSE (Kuo et al., 2022). Bailey et al. (2015), montrent que la tubuline dénaturée est toujours en mesure d'interagir avec la Katanine, ce qui serait cohérent avec l'hypothèse. Malgré cela, le mécanisme précis d'extraction associé à une dénaturation de la tubuline n'a pas encore été démontré.

Certains points critiques restent encore à être abordés tels que l'interaction de l'enzyme avec le substrat ou le nombre de tubulines nécessaire à extraire en un temps limité pour générer l'instabilité du microtubule entraînant sa coupure. Il est indispensable que cette activité d'extraction de tubulines soit rapide et efficace, car il a été démontré *in vitro* qu'en cas d'apport suffisant de tubuline-GTP libre dans le milieu, une réparation autonome du microtubule peut se réaliser après l'action de la Spastine ou de la Katanine sur celui-ci (Vemu et al., 2018). L'hypothèse privilégiée est qu'un équilibre se met alors en place dans la cellule entre coupure massive des microtubules par les MSE et réparation autonome du microtubule. *Comment cette activité de coupure des microtubules est-elle modulée dans la cellule ?*

D. Interaction des MSE avec les microtubules

i. *Interaction directe des MSE avec le microtubule*

Le mécanisme de coupure des microtubules par les MSE est strictement dépendant de l'interaction de l'enzyme avec le microtubule. L'accessibilité de l'enzyme à son substrat est ainsi un moyen de réguler efficacement son activité enzymatique. Dans la littérature, certaines études ont permis d'en connaître davantage sur le mode d'interaction de l'enzyme avec le microtubule, mais ce n'est pas le cas pour toutes les MSE.

L'interaction de la Spastine avec les microtubules a été caractérisée. Un domaine d'interaction directe de la Spastine avec les microtubules a été identifié chez *Drosophila melanogaster* (White et al., 2007). Les auteurs identifient une région essentielle à l'interaction directe avec les microtubules (MTBD) *in vitro* à l'aide d'un test de pontage chimique avec les microtubules (« cross-link ») à partir de protéines purifiées. Ils caractérisent aussi ce domaine *in vivo* en sur-exprimant dans des cellules en culture, des fragments de la Spastine qui ne contiennent plus cette région, et perdent leur co-localisation avec le réseau de microtubules. Les auteurs démontrent que cette région localisée entre le domaine MIT et le domaine AAA est aussi requise pour l'activité de coupure des microtubules *in vitro*. Chez *Caenorhabditis elegans*, le MTBD de SPAS-1 a aussi été identifié (Matsushita-Ishiodori et al., 2009). Cependant, il est important de souligner que bien que ce domaine est localisé au même endroit en terme d'organisation des domaines protéiques (MIT ; MTBD ; AAA), la séquence n'est pas strictement conservée entre les homologues de la Spastine chez l'humain, la drosophile et le nématode.

Une seconde région de la Spastine est mise en évidence pour interagir directement avec les microtubules : le pore central via les boucles (loop 1 et loop 2). En effet, les auteurs montrent que la Spastine sous forme d'hexamère est capable d'interagir directement *in vitro* avec les queues carboxy-terminales de la tubuline. Cette observation est confirmée quelques années plus tard par les études de la structure du pore central de la Spastine en interaction avec un peptide comme décrit précédemment (Sandate et al., 2019).

Cependant, le MTBD domaine caractérisé chez la Spastine n'est absolument pas conservé chez la Katanine qui a la particularité d'être composée de deux sous-unités. Le mode d'interaction de la Katanine avec les microtubules semble donc se différencier de celui de la Spastine. Il a été montré chez *C. elegans* que la sous-unité régulatrice MEI-2^{P80} est suffisante pour interagir avec les microtubules *in vitro* (Joly et al., 2016). En effet, cette sous-unité, qui stabilise l'hexamère, est nécessaire à l'interaction enzyme-substrat essentielle à la coupure des microtubules. Cependant, aucun domaine précis d'interaction dans cette sous-unité n'a été caractérisé à ce jour. De plus, Zehr et al., (2020) ont résolu

par cryo-microscopie électronique la structure du pore central d'un hexamère de la sous-unité catalytique MEI-1^{p60} chez *C. elegans* en interaction avec un poly-peptide de glutamates, mimant la queue carboxy-terminale de la tubuline, comme cela a été démontré pour la Spastine. Néanmoins, si cette étude montre qu'un hexamère de fragments de p60 est suffisant pour interagir avec la queue carboxy-terminale de la tubuline, la présence de p80 est requise pour l'activité du complexe Katanine p60:p80 (Zehr et al., 2020), ce qui souligne l'importance du rôle de la sous-unité régulatrice MEI-2^{p80} dans l'activités de la Katanine.

Chez *Arabidopsis thaliana*, la sous-unité régulatrice ne présente pas un rôle essentiel d'interaction avec les microtubules que l'on retrouve chez les animaux car la sous-unité catalytique de la Katanine seule peut couper les microtubules *in vitro* (Stoppin-Mellet et al., 2002). Toutefois, la sous-unité régulatrice reconnaît les croisements de microtubules et permet la localisation spécifique du complexe p60:p80 pour couper les microtubules (Wang et al., 2017). Ce résultat met en évidence le rôle capital de la sous-unité régulatrice dans le contrôle de l'activité de la Katanine chez *Arabidopsis thaliana*. Le domaine d'interaction directe avec les microtubules a été identifié dans la partie N-terminale de la sous-unité catalytique p60 qui est requis pour l'activité de coupure, mais aussi pour la stimulation de l'activité ATPase par la présence de microtubules (Stoppin-Mellet et al., 2007). Cependant, ce domaine précis de p60 n'est absolument pas conservé avec les autres espèces, telles que les mammifères ou les nématodes par exemple. McNally and McNally (2011) discutent d'un lien direct entre les résultats chez *Arabidopsis thaliana* (Stoppin-Mellet et al., 2007) et la sous-unité KATNBL1 chez l'humain. L'affinité du domaine N-terminal de ces p60 pour les microtubules est faible : environ 15% de microtubules liés, alors que les sous-unités régulatrices de l'humain présentent une affinité plus forte pour les microtubules, telle que 90% de microtubules liés. Cela met en évidence le rôle fondamental de la sous-unité régulatrice pour l'interaction de la Katanine avec les microtubules.

A partir de l'ensemble de ces données de la littérature, nous pouvons proposer une hypothèse quant au mode d'interaction des MSE avec les microtubules requis pour l'activité de coupure. La Spastine organisée en homo-hexamère semble présenter deux modes d'interaction différents avec les microtubules. Ce sont deux modes qui peuvent être mis en parallèle avec ceux de la Katanine. La Katanine, quant à elle, est assemblée de 6 dimères composés chacun d'une sous-unité catalytique p60 et une sous-unité régulatrice p80 dont les fonctions sont distinctes. Le mécanisme d'interaction des MSE serait réalisé en deux étapes. La première étape serait une interaction directe entre le MTBD de la Spastine et la surface du microtubule. Chez la Katanine, la sous-unité p80 assure cette fonction. Cette interaction spécifique aiderait la mise en place fonctionnelle de l'enzyme sur la surface du microtubule. La queue carboxy-terminale d'une tubuline pourrait ainsi entrer dans le pore central de l'enzyme et assurer la seconde étape du mécanisme d'interaction. Le pore central de l'hexamère de la

Spastine ou de p60 pour la Katanine interagit directement avec la queue carboxy-terminale de la tubuline pour débiter son extraction du microtubule et causer les dommages au microtubule conduisant à sa coupure.

ii. Cible des MSE sur le microtubule

Dans le but de couper le microtubule et de stimuler une nouvelle dynamique de celui-ci, les MSE interagissent à sa surface. *Mais sont-elles capables de reconnaître un motif spécifique sur le microtubule pour s'y fixer ?* D'après les études *in vitro* d'activité des MSE à partir de protéines purifiées fluorescentes, les dommages causés par les MSE sur le microtubule sont observés le long du microtubules (Vemu et al., 2018). Les MSE ne semblent pas se localiser spécifiquement à l'une des deux extrémités du microtubule pour pouvoir le couper, mais interagissent de façon aléatoire sur la longueur du microtubule. Cela suggère qu'elles sont en mesure de cibler spécifiquement un motif répété le long du microtubule, ou présent de façon aléatoire le long du microtubule.

Chez *Arabidopsis thaliana*, la Katanine cible spécifiquement un croisement entre deux microtubules pour couper précisément à ce croisement et orienter les microtubules de façon parallèle (Lindeboom et al., 2013; Wang et al., 2017). Dans ce cas précis, l'enzyme est capable d'identifier une structure spécifique du microtubule.

De plus, il a été décrit que les modifications post-traductionnelles de la tubuline, peuvent moduler l'activité de coupure des microtubules des MSE. Par exemple, la Fidgetine favorise la coupure des microtubules riches en tubulines tyrosinylées (Hu et al., 2017). La Katanine cible préférentiellement des microtubules acétylés pour les couper *in vivo* (Sudo and Baas, 2010) alors que l'activité de la Spastine n'est pas modifiée par l'acétylation des microtubules (Sudo and Baas, 2010; Valenstein and Roll-Mecak, 2016). Ces études ne permettent pas à ce jour de déterminer si l'effet de l'acétylation de tubuline α est direct ou indirect sur l'activité de la Katanine. L'acétylation de la tubuline est retrouvée sur le corps de la tubuline α (Lys40) (Roll-Mecak, 2020). Une hypothèse qui pourrait être proposée est que cette modification favorise l'interaction primaire de la Katanine avec la surface du microtubule. Toutefois, le résidu modifié étant enfoui à l'intérieur du microtubule, ce serait probablement la stabilité du microtubule qui modulerait l'activité de la Katanine (Roll-Mecak, 2020). Une autre modification post-traductionnelle de la tubuline qui stimule l'activité de coupure des microtubules de la Spastine est la polyglutamylolation de la queue carboxy-terminale de la tubuline (Lacroix et al., 2010; Valenstein and Roll-Mecak, 2016). Plus particulièrement, ce sont les longues chaînes de glutamylations qui ont un effet plus important (Lacroix et al., 2010). Cependant, à partir

d'une certaine longueur de la chaîne de polyglutamylations, l'activité de coupure des microtubules par la Spastine se trouve inhibée (Valenstein and Roll-Mecak, 2016).

Il a aussi été montré que l'interaction directe de la Spastine et de la Katanine avec les microtubules est plus fortement affectée en absence de la queue carboxy-terminale de tubuline β que celle de la tubuline α (Bailey et al., 2015; Johjima et al., 2015; Valenstein and Roll-Mecak, 2016; Zehr et al., 2020). Ces résultats sont directement liés à l'activité de coupure des microtubules, car la déplétion de la queue carboxy-terminale de la tubuline β affecte plus drastiquement l'activité enzymatique de la Spastine et la Katanine que la tubuline α qui affecte déjà fortement leur activité (Valenstein and Roll-Mecak, 2016; Zehr et al., 2020). La présence de queues carboxy-terminales de la tubuline β libres dans le milieu inhibe plus fortement l'activité de la Katanine que celles de la tubuline α (Bailey et al., 2015). La tubuline β serait donc la cible privilégiée de la Katanine et la Spastine pour son extraction du microtubule. Toutefois, l'ensemble de ces données ne permettent pas d'identifier une cible pour l'interaction primaire de la MSE à la surface du microtubule, celle-ci reste encore à déterminer.

iii. Interaction indirecte des MSE avec les microtubules

Les MSE interagissent directement avec la surface des microtubules pour pouvoir les couper. Il arrive aussi que ces enzymes interagissent avec un partenaire protéique dans la cellule pour se localiser spécifiquement sur une structure donnée.

ASPM-1 (Abnormal SPindles and primary Microcephaly 1) est une protéine régulatrice de la division cellulaire, requise pour contrôler la dynamique d'assemblage du fuseau mitotique. Un défaut de son activité cause de sévères microcéphalies chez l'humain. Durant la mitose, la Katanine et ASPM-1 co-localisent aux pôles du fuseau mitotique. Ces deux protéines sont chacune essentielles à la formation d'un fuseau bipolaire et correctement orienté. ASPM-1 et la Katanine interagissent directement entre elles (Jiang et al., 2017). En utilisant une approche biochimique, les auteurs démontrent que cette interaction a lieu uniquement lorsque p60 et p80 forment un dimère. Plus précisément, en résolvant la structure de l'interaction d'un fragment de ASPM-1 et de fragments de p60:p80, ils montrent que cette interaction ASPM-1•Katanine a lieu à l'interface p60:p80 (Jiang et al., 2017). La présence de ASPM-1 amplifie l'activité de coupure des microtubules de la Katanine. Les auteurs proposent que l'interaction directe de ASPM-1 avec la Katanine permet le recrutement de la Katanine proche du microtubule pour le couper. Une étude de génétique démontre que la Katanine recrute ASPM-1 aux pôles du fuseau (Connolly et al., 2014). Cependant l'absence de l'une des deux protéines n'empêche pas la localisation de la seconde. Cela suggère que la localisation de l'une sur le

fuseau ne dépend pas exclusivement de son recrutement par la seconde (Connolly et al., 2014; Jiang et al., 2017; McNally and McNally, 2011).

CAMSAP (calmodulin-regulated spectrin-associated protein) est une autre MAP qui interagit directement avec la Katanine dans la cellule (Jiang et al., 2014; Jiang et al., 2018). Les membres de la famille CAMSAP/patronin sont des protéines qui ciblent les extrémités négatives des microtubules pour réguler leur stabilité et leur organisation dans un système non centrosomal indépendamment de γ -TuRC. De la même façon que ASPM-1, CAMSAP2 et CAMSAP3 interagissent à l'interface p60:p80 de la Katanine chez les mammifères. Les mêmes résidus de la Katanine sont impliqués dans l'interaction avec ASPM-1 et avec CAMSAP, alors que ASPM-1 et CAMSAP ne partagent pas le même domaine d'interaction (Jiang et al., 2017; Jiang et al., 2018). Le complexe protéique Katanine●CAMSAP formé et localisé à l'extrémité négative des microtubules permet de réguler négativement l'activité des CAMSAPs (Jiang et al., 2014; Jiang et al., 2018). Cependant, le rôle exact de la Katanine dans ce contexte cellulaire n'est pas encore défini.

III. Les Katanines chez *Caenorhabditis elegans*

A. *Caenorhabditis elegans*, notre modèle d'étude

i. *C. elegans* : organisme modèle et outil biologique

Afin d'étudier précisément le mécanisme d'action des MSE dans la cellule, nous utilisons au laboratoire l'organisme modèle *Caenorhabditis elegans*. Cet animal est un nématode dont la majorité des mécanismes cellulaires sont conservés avec les mammifères et les autres animaux. De plus, il possède de nombreux avantages en qualité d'organisme modèle.

Ce ver se cultive très facilement en laboratoire à température ambiante et possède un cycle de vie relativement court. Un œuf pondu se développe et atteint un stade adulte en environ 3 jours à partir duquel il peut à son tour pondre une nouvelle descendance. *C. elegans* est un ver hermaphrodite qui se reproduit seul : la fécondation d'un de ses ovocytes par un de ses spermatozoïdes conduit à la génération d'un embryon qui poursuit ses premiers stades de développement dans l'utérus du ver. Une fois pondu, l'embryon est indépendant de l'environnement auquel il est exposé grâce à la coque qui le contient. Il se développe jusqu'à atteindre le premier stade larvaire appelé L1 à partir duquel il éclot de sa coque. La larve suit son développement en passant par les stades larvaires L2, L3, L4 puis le stade adulte où il est en mesure de se reproduire (**Figure 13**).

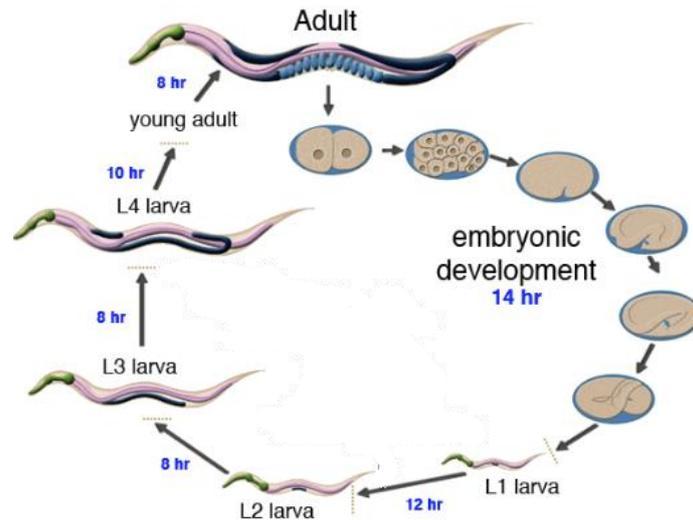


Figure 13 : Représentation schématique du cycle de vie de *Caenorhabditis elegans*. Un embryon se développe *in utero* entouré d'une coquille jusqu'à ce qu'il soit pondu. Il poursuit son développement jusqu'à éclosion de la larve. *C. elegans* va ensuite passer par les 4 stades larvaires L1, L2, L3 et L4 pour atteindre l'âge adulte et produire à nouveau des embryons. Figure extraite de Wormatlas.org.

C. elegans possède deux gonades où sont produits les gamètes mâles et femelles. Les cellules souches germinales diploïdes « subissent » des divisions mitotiques dans la partie distale de la gonade pour se multiplier. Lorsque le ver est au stade L3 de développement larvaire, les cellules germinales se différencient pour former un stock définitif de spermatozoïdes dans la spermathèque de chacune des deux gonades. Les cellules germinales changent ensuite de destinée pour se différencier en ovocytes et ce, tout le long de la vie du ver. La période de reproduction du ver est donc limitée par le nombre de spermatozoïdes disponibles. La position des ovocytes dans la gonade est en lien direct avec leur état de maturation. En effet, lorsque les cellules germinales progressent vers la partie proximale de la gonade, leur stade de différenciation est plus avancé (**Figure 14**). L'ovocyte le plus proche de la spermathèque est exposé au MSP (Major Sperm Protein), un signal hormonal spermatique diffusé dans la gonade proximale pour stimuler la contraction de l'utérus permettant le mouvement des ovocytes vers la spermathèque. Le MSP favorise aussi la maturation de l'ovocyte de la prophase I jusqu'à la rupture de son enveloppe nucléaire (Greenstein, 2005). Il a aussi été montré qu'à cette étape de maturation, le MSP induit une réorganisation du réseau de microtubules qui se met en place proche des chromosomes. Cela est proposé comme facilitant la capture des microtubules par la chromatine après la rupture de l'enveloppe nucléaire (Harris et al., 2006). Grâce au mouvement de la gonade, l'ovocyte traverse la spermathèque où il est fécondé par un spermatozoïde. La fécondation conditionne l'axe antéro-postérieur du zygote. L'entrée du spermatozoïde dans le cytoplasme de l'ovocyte dicte le côté postérieur de l'embryon. La fécondation par le spermatozoïde déclenche la migration des chromosomes de l'ovocyte vers le pôle antérieur du zygote pour poursuivre la méiose.

Le réseau de microtubules se met alors en place autour des chromosomes de façon rapide et efficace pour assembler le premier fuseau méiotique. Cette première division méiotique permet la séparation des chromosomes homologues et la formation du premier globule polaire. La deuxième division méiotique s'enchaîne avec l'assemblage du second fuseau méiotique entraînant l'élimination d'une chromatide sœur de chacun des chromosomes restants dans le second globule polaire.

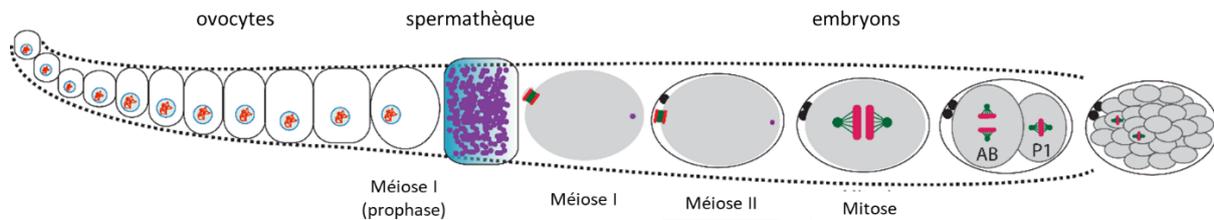


Figure 14 : Représentation schématique de l'organisation d'une gonade de *Caenorhabditis elegans*. Les ovocytes méiotiques en cours de maturation (gauche de la gonade) atteignent la spermathèque où ils seront fécondés par un spermatozoïde. Après la fécondation, la méiose femelle I et II se poursuit puis le développement embryonnaire débute.

L'un des plus grands avantages d'utiliser *C. elegans* comme organisme modèle est sa rapidité de développement et sa capacité à se reproduire seul. Cela implique qu'il a été très largement utilisé comme outil de génétique pour caractériser de nombreux gènes et mettre en évidence de nombreuses interactions génétiques en caractérisant un phénotype donné, tel que la létalité embryonnaire, un défaut de polarité ou la stérilité par exemples.

Une autre caractéristique de ce nématode est la génération d'animaux mâles. Ces individus mâles se développent à partir d'un zygote possédant un seul chromosome sexuel X au lieu de XX chez l'hermaphrodite. Ils sont issus d'un défaut de ségrégation des chromosomes sexuels au cours de la méiose femelle. Les mâles ont la capacité de se reproduire avec des hermaphrodites. Ils s'accouplent et transmettent leurs spermatozoïdes capables de féconder les ovocytes de l'hermaphrodite. Le zygote généré contient un matériel génétique provenant à moitié de l'hermaphrodite et à moitié du mâle. Ainsi, il est possible de générer des mâles au laboratoire à l'aide d'un choc thermique durant la méiose femelle causant l'anomalie chromosomique et de les croiser avec des hermaphrodites.

Aujourd'hui il est très courant de manipuler les vers pour les modifier génétiquement pour répondre à des questions biologiques en y ajoutant des mutations, en fusionnant un fluorophore à une protéine d'intérêt, ou encore en modifiant l'expression d'un gène.

Une des pratiques d'édition du génome que nous avons utilisé chez *C. elegans* au cours de ma thèse est la méthode MosSCI (Frøkjær-Jensen et al., 2008). Le principe est d'introduire un transgène à un locus défini du génome. La souche de vers utilisée contient un transposon Mos à un locus défini sur un des chromosomes. Un plasmide codant le transgène d'intérêt et un second codant une transposase sont micro-injectés dans la gonade du vers où se trouvent les cellules germinales mitotiques. Le transgène pourra s'intégrer dans le génome de ces cellules par recombinaison homologue avec le transposon Mos, suite aux coupures des brins d'ADN par la transposase. La souche de vers a été modifiée spécifiquement sur son gène *unc* pour affecter drastiquement la mobilité des vers. Le transgène à injecter contient notre gène d'intérêt mais aussi le gène *unc*. Il devient alors plus facile de cribler la présence du transgène dans les vers, en analysant la mobilité de la descendance du ver injecté restaurée par l'expression du gène *unc*. La correcte insertion du transgène au locus *mos* est vérifiée par PCR car il est possible que le plasmide injecté ne s'insère pas dans le génome mais reste sous forme plasmidique et sera éliminé au cours des générations.

Une méthode qui est couramment utilisée chez *C. elegans* pour étudier l'effet de l'absence d'expression d'un gène est l'utilisation d'ARN interférent (ARNi) correspondant à l'ARNm du gène ciblé. Grâce à sa séquence complémentaire, l'ARNi peut s'hybrider sur l'ARNm. Une machinerie cellulaire se met alors en place pour l'envoyer à la dégradation. Ainsi la traduction de la protéine codée par le gène d'intérêt est inhibée. Expérimentalement, les vers sont exposés à des ARNi soit par microinjection de l'ARNi dans l'organisme ou par ingestion de bactéries *E. coli* transformées avec un plasmide exprimant cet ARNi. Les conséquences de l'ARNi sont analysées sur la première descendance.

Un autre avantage d'utiliser ce ver comme organisme modèle est qu'il a la particularité d'être entièrement transparent du stade embryonnaire jusqu'à l'âge adulte. Cela permet de suivre par microscopie (DIC) les événements cellulaires qui se produisent dans l'ensemble du nématode. Cet animal est largement utilisé comme modèle dans la biologie du développement par exemple, car il est possible de filmer la totalité du développement embryonnaire à partir de la fécondation de l'ovocyte *in utero* ou *ex utero* après dissection des vers. Il est ainsi possible de suivre et de caractériser les événements cellulaires qui ont lieu au cours des deux divisions méiotiques puis de toutes les divisions mitotiques de l'embryon au cours de son développement.

ii. Les MSE chez *C. elegans*

Chez *C. elegans* plusieurs MSE sont exprimées. La Spastine SPAS-1 est localisée dans la région périnucléaire des embryons (Matsushita-Ishiodori et al., 2007) et a été caractérisée comme étant requise pour l'ovogenèse. La Fidgetin-like 1 (FIGL-1) est localisée dans les noyaux des cellules

germinales mitotiques et des embryons en mitose. Elle est essentielle pour réguler la ségrégation des chromosomes (Luke-Glaser et al., 2007; Onitake et al., 2012). Enfin, la Katanine^{MEI-1•MEI-2} composée de MEI-1^{p60} et MEI-2^{p80} est exprimée au cours de la méiose femelle et son activité de coupure des microtubules est critique pour l'assemblage du fuseau méiotique (Joly et al., 2016; McNally et al., 2006; Srayko et al., 2000; Srayko et al., 2006). Cependant, il existe deux autres sous-unités régulatrices exprimées dans le ver, F47G4.4 et F47G4.5 dont le rôle dans la cellule n'a pas encore été décrit.

*iii. Organisation et dynamique des microtubules au cours des divisions cellulaires chez *Caenorhabditis elegans**

La division méiotique femelle :

La particularité de la division méiotique femelle chez *C. elegans* est l'absence de centrosome due à l'élimination des centrioles au cours de l'ovogenèse. Les centrosomes sont apportés plus tard par le spermatozoïde lors de la fécondation. Les microtubules doivent donc nucléer, polymériser et s'organiser en réseau en absence de ces centres organisateurs du réseau de microtubules. Cela soulève de nombreuses questions quant aux mécanismes moléculaires utilisés par la cellule pour former de façon successive deux fuseaux dynamiques, bipolaires et acentrosomaux. *Quels sont les points de nucléation des microtubules en absence de centrosome ? Comment l'organisation du réseau de microtubules au niveau des pôles est-elle mise en place ?*

Lorsque l'enveloppe nucléaire de l'ovocyte commence à se rompre, un enrichissement en tubuline se forme à l'intérieur du noyau. Les microtubules polymérisent et s'organisent sous forme de faisceaux pour former une cage autour des chromosomes (**Figure 15**)(Chuang et al., 2020). Cette étape a lieu uniquement durant la méiose I. En méiose II, les microtubules semblent directement nucléer autour des chromosomes. Puis, ils s'organisent alors de telle sorte que leurs extrémités négatives se situent à l'extérieur de la structure de façon à former de multiples pôles du fuseau en cours d'assemblage. Les pôles fusionnent ensuite pour organiser ce réseau de microtubules en un fuseau bipolaire permettant un placement des chromosomes sur la plaque métaphasique (Mullen et al., 2019). Au cours de la transition de la métaphase vers l'anaphase, le réseau de microtubules pivote de façon perpendiculaire à la membrane plasmique et subit une réorganisation. Dès le début de l'anaphase, le fuseau, composé de microtubules courts, se raccourcit, les pôles s'élargissent et les microtubules dépolymérisent (**Figure 15**). La densité des microtubules devient plus importante au niveau du fuseau central. La ségrégation des chromosomes est assurée par des forces de pression générées par des glissements des microtubules antiparallèles du fuseau central (Mullen et al., 2019; Laband et al., 2017; Lantzsch et al., 2021). Une invagination de la membrane plasmique de part et d'autre du fuseau, entraîne la

formation du sillon de cytokinèse au milieu du fuseau et la formation d'un globule polaire permettant l'exclusion des chromosomes surnuméraires. Le volume du globule polaire dépend de la taille et de l'organisation du fuseau méiotique (Mains et al., 1990a). Dans le cas d'un long fuseau méiotique, le volume du globule polaire sera plus important. Lorsque le fuseau n'est pas correctement assemblé, alors la formation du globule polaire n'est pas correctement réalisée, le volume de celui-ci est plus important et plus aléatoire.

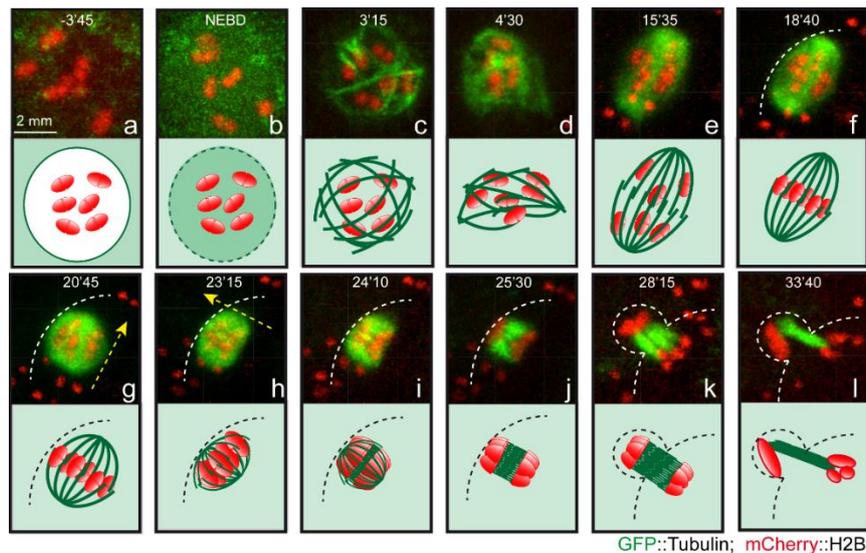


Figure 15 : Assemblage et dynamique du fuseau méiotique femelle chez *Caenorhabditis elegans*. Observation par microscopie photonique et représentation schématique par étapes du fuseau de microtubules d'embryons exprimant GFP::tubuline et mCherry::histone : (a) noyau de l'embryon méiotique en prophase, (b) rupture de l'enveloppe nucléaire et enrichissement du noyau en tubuline, (c) formation de la cage de microtubules autour des chromosomes, (d-e) organisation du réseau de microtubules et formation des pôles du fuseau, (f) alignement des chromosomes sur la plaque métaphasique, (g) raccourcissement du fuseau méiotique, (h) rotation du fuseau, (i-j) début de l'anaphase et densification des microtubules entre les deux « groupes » de chromosomes, (k-l) fin de ségrégation des chromosomes et formation du globule polaire. Figure réalisée par Lionel Pintard.

Le mécanisme de nucléation précoce des microtubules durant la prophase I de méiose n'est pas connu. Cependant, au cours des étapes plus tardives de la méiose, plusieurs acteurs protéiques participent activement à l'assemblage du fuseau bipolaire acentrosomal. KLP-18, membre de la famille des Kinesine-12, contribue à l'orientation des extrémités négatives des microtubules à la périphérie du réseau en cours d'assemblage. La Katanine, ASPM-1 et KLP-7, l'homologue de MCAK et membre de la famille des Kinesine-13, sont essentiels pour former les deux pôles au fuseau et contrôlent la longueur des microtubules du fuseau acentrosomal (Srayko et al., 2006; Connolly et al., 2014; Mullen et al., 2019).

La division mitotique :

Afin d'assembler et d'organiser le fuseau mitotique bipolaire, la majorité des microtubules du fuseau émanent des deux centrosomes. Le centrosome est le MTOC apporté par le pronoyau mâle qui est dupliqué juste après la fécondation de l'ovocyte. Au cours de la mitose, trois types de réseaux de microtubules sont observés : les microtubules astraux polymérisent à partir des centrosomes pour rejoindre le cortex de l'embryon dans le but de positionner et stabiliser le fuseau à une position précise pour définir l'asymétrie de la division. Les microtubules « kinétochoriens » proviennent aussi des centrosomes pour connecter les kinétochores des chromosomes. Puis les microtubules du fuseau central s'assemblent entre les chromosomes (chromatides sœurs) au cours de leurs ségrégations (anaphase). Ils sont organisés de façon antiparallèle au milieu du fuseau, ce qui déterminera la position du sillon de cytokinèse (**Figure 16**) (Prosser and Pelletier, 2017; Pintard and Bowerman, 2019).

Au cours de la première division mitotique de l'embryon de *C. elegans*, les pronoyaux mâle et femelle migrent l'un vers l'autre pour se rencontrer (**Figure 16**). Ainsi les deux centrosomes formés se placent de chaque côté de l'interface des deux pronoyaux. La dynamique des microtubules astraux permet une rotation des deux pronoyaux afin de positionner les deux centrosomes de façon parallèle à l'axe antéro-postérieur de l'embryon (**Figure 16**). Au cours de la rupture de l'enveloppe nucléaire les microtubules kinétochoriens sont en mesure de connecter les chromosomes via leur kinétochore pour les placer sur la plaque métaphasique. Une fois que chacune des chromatides sœurs d'un chromosome est connectée par des microtubules provenant d'un seul des deux centrosomes, l'anaphase peut débuter (**Figure 16**). Cette étape critique de la mitose permet la correcte séparation des chromatide sœurs de part et d'autres de la cellule. Elle est soumise aux forces de tractions des microtubules astraux qui tirent sur les centrosomes et les chromosomes qui leur sont liés. Le fuseau central composé de microtubules antiparallèles se met alors en place entre les deux « groupes » de chromosomes à partir de leurs kinétochores (**Figure 16**). Ce réseau de microtubules et de protéines s'oppose aux forces des microtubules astraux afin d'empêcher une séparation trop rapide des centrosomes et chromosomes (Pintard and Bowerman, 2019). En même temps, se coordonne l'invagination du sillon de cytokinèse par l'assemblage de l'anneau contractile d'actine aligné de façon perpendiculaire avec le milieu du fuseau central conduisant à la formation de deux cellules filles distinctes (**Figure 16**).

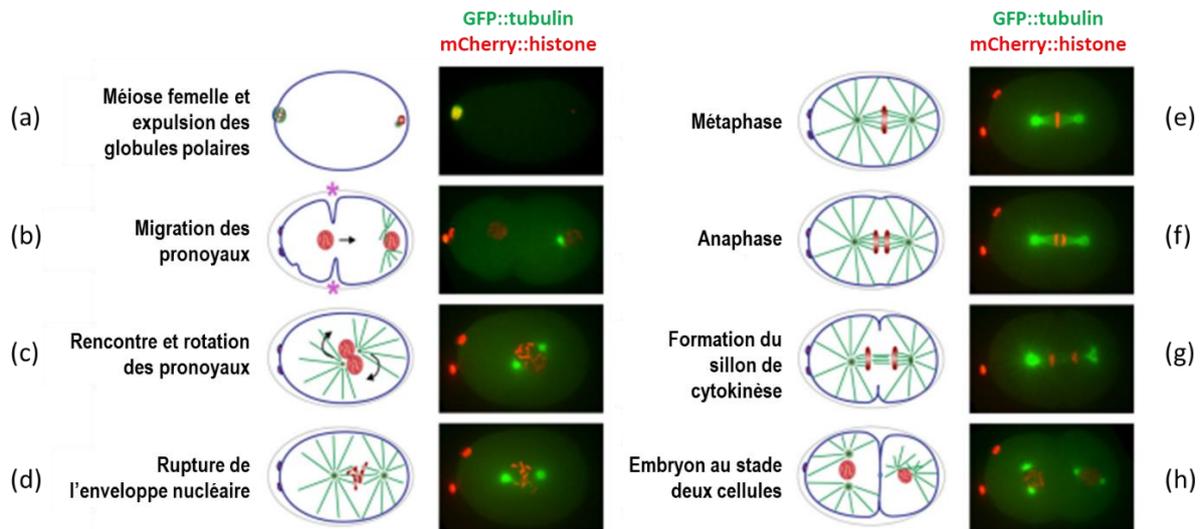


Figure 16 : Dynamique de la division mitotique d'un embryon précoce chez *Caenorhabditis elegans*. Observation par microscopie confocale d'embryon en division exprimant GFP::tubuline et mCherry::histone associée à une représentation schématique par étapes. Figure adaptée de (Hattersley et al., 2018).

B. Rôle des Katanines chez *C. elegans*

i. Les différentes sous-unités de la Katanine chez *C. elegans*

Chez *C. elegans*, les gènes *mei-1* (MEIosis defect-1) et *mei-2* (MEIosis defect-2), codant respectivement pour la sous-unité catalytique MEI-1 et la sous-unité régulatrice MEI-2, ont été identifiés par crible génétique de mutations à effet maternel conduisant à une létalité embryonnaire (Mains et al., 1990a; Mains et al., 1990b). Des mutations de *mei-1* et/ou *mei-2* causant un défaut d'activité de la Katanine^{MEI-1•MEI-2}, entraînent la formation de gros globules polaires associée à une forte létalité (**Figure 17**). Ce phénotype est la conséquence d'un défaut d'assemblage du fuseau méiotique femelle. L'expression de ces deux gènes est requise dans les embryons méiotiques pour l'assemblage du fuseau méiotique femelle chez *C. elegans* (Joly et al., 2016; McNally et al., 2006; Srayko et al., 2000; Srayko et al., 2006).

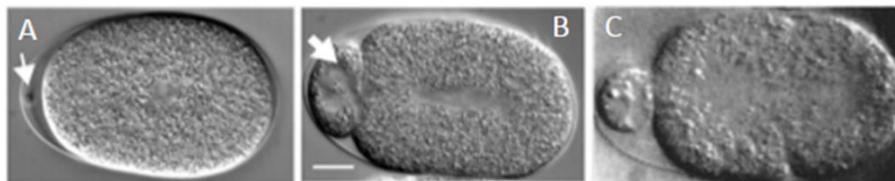


Figure 17 : Phénotype des gros globules polaires causés par défauts d'activité de la Katanine^{MEI-1•MEI-2} au cours de la méiose femelle chez *C. elegans*. Images de DIC d'embryon au stade une cellule en division en condition contrôle (A), exposé à *mei-1(RNAi)* (B) ou exposé à *mei-2(RNAi)* (C). Le volume du globule polaire pointé par les flèches blanches est bien supérieur à la condition contrôle lorsque l'activité de la Katanine^{MEI-1•MEI-2} est déficiente.

Deux autres gènes codant pour des sous-unités régulatrices ont été identifiés chez *C. elegans* : *f47g4.4* et *f47g4.5* codant pour les sous-unités F47G4.4 et F47G4.5. Parmi les trois sous-unités régulatrices, F47G4.4 est une sous-unité p80 alors que F47G4.5 et MEI-2 sont des sous-unités p80-like car elles ne contiennent pas le domaine WD40, mais partagent uniquement le domaine con80 (Srayko et al., 2000). Même si leurs séquences ne sont pas strictement conservées, les domaines fonctionnels le sont (Figure 9).

L'expression d'une sous-unité catalytique (MEI-1) et trois sous-unités régulatrices (F47G4.4, F47G4.5 et MEI-2) dans le même organisme suggère que potentiellement au moins trois Katanines différentes peuvent être assemblées chez *C. elegans* : MEI-1•F47G4.4 ; MEI-1•F47G4.5 et MEI-1•MEI-2. Cela implique que chacune de ces Katanines dispose d'une spécificité. Il a été largement démontré que le complexe MEI-1•MEI-2 est actif au cours de la méiose femelle. Srayko et al. (2000) montrent que chacune de ces deux sous-unités F47G4.4 et F47G4.5 interagissent avec MEI-1 *in vivo* lorsqu'elles sont surexprimées dans des cellules humaines HeLa. Ce résultat suggère fortement que ces sous-unités peuvent s'assembler sous forme d'un complexe actif Katanine^{MEI-1•F47G4.4} ou Katanine^{MEI-1•F47G4.5}. Les transcrits de *f47g4.4* et *f47g4.5* ont été identifiés dans certains neurones du système nerveux de *C. elegans*, où est aussi exprimé *mei-1* (Taylor et al., 2021). Cependant, la localisation et le rôle des protéines F47G4.4 et F47G4.5 dans le ver n'ont pas encore été décrits. A ce jour, il n'a pas été démontré *in vivo* chez *C. elegans* la formation de complexes Katanine^{MEI-1•F47G4.4} et Katanine^{MEI-1•F47G4.5} actifs permettant une coupure de microtubules efficace au cours d'un événement cellulaire précis.

ii. Une Katanine de *C. elegans* : complexe MEI-1•MEI-2

La Katanine la plus étudiée chez *C. elegans* composée de MEI-1 et MEI-2. Ces deux sous-unités s'assemblent en hexamère de dimères MEI-1•MEI-2 afin de constituer un complexe enzymatique capable de couper les microtubules en utilisant l'hydrolyse de l'ATP. A ce jour, la structure du complexe n'a été résolue que partiellement. Tout d'abord, la structure du domaine AAA de MEI-1 puis de MEI-1 pleine taille ont été résolus par rayons X et cryo-microscopie électronique (Zehr et al., 2017; Nithianantham et al., 2018; Zehr et al., 2020). En revanche, la structure de MEI-2 n'a donc pas encore été résolue, ce sont seulement des modèles structuraux basés sur la conservation des résidus qui ont été proposés. Il est proposé qu'un large domaine en N-terminal de MEI-2 est désorganisé (Figure 18), ce qui pourrait compliquer la résolution de la structure du complexe enzymatique entier. La partie carboxy-terminale de MEI-2 est organisée sous forme de plusieurs hélices. L'interface entre p60:p80 a pu être résolue chez la souris par exemple (Jiang et al., 2017) mais ce n'est pas encore le cas chez *C. elegans*.

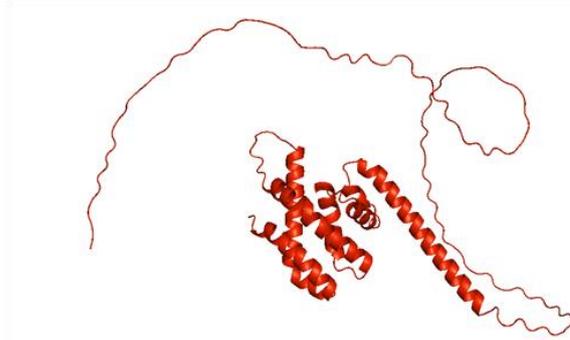


Figure 18 : Modèle structural de la sous-unité MEI-2 de la Katanine chez *C. elegans*. Modèle structural réalisé sur Pymol à partir des données AlphaFold2. La partie C-terminale de MEI-2 contenant le domaine con80 est prédite pour être organisée sous forme d'hélices alors que la partie N-terminale n'est pas structurée.

Un hexamère constitué de la sous-unité catalytique MEI-1 est suffisant pour hydrolyser de l'ATP (Joly et al., 2016) comme c'est le cas chez d'autres espèces (Hartman et al., 1998). Cependant, l'association des deux sous-unités MEI-1 et MEI-2 est indispensable à l'activité de coupure des microtubules (McNally et al., 2006), qui est requise pour l'assemblage du fuseau méiotique femelle chez *C. elegans*. Il a été décrit que la partie N-terminale de MEI-1 (1-198) est suffisante pour interagir avec MEI-2 (McNally and McNally, 2011).

La sous-unité régulatrice MEI-2 confère une interaction directe de la Katanine avec la surface du microtubule (Joly et al., 2016). Les données de McNally and McNally, (2011) suggèrent aussi fortement que la présence de MEI-2 est suffisante à localiser MEI-1 sur le réseau de microtubules dans des fibroblastes de Xénope. De plus, il a été montré *in vitro* que l'activité ATPase de MEI-1 peut être stimulée par les microtubules uniquement en présence de MEI-2. Notre hypothèse est la suivante : l'interaction directe de MEI-2 avec la surface du microtubule pourrait entraîner une stimulation de l'activité ATPase de la Katanine^{MEI-1•MEI-2} assurée par les sous-unités MEI-1 de l'hexamère (Joly et al., 2016; Zehr et al., 2020), qui pourrait être utile pour l'extraction de la tubuline du microtubule. La sous-unité régulatrice de la Katanine^{MEI-1•MEI-2} agit donc tel un adaptateur de la sous-unité catalytique sur son substrat. La sous-unité régulatrice est alors en mesure de réguler spécifiquement l'activité de l'enzyme.

De plus, il a été observé que la Katanine^{MEI-1•MEI-2} peut former des faisceaux de microtubules *in vitro*, alors que MEI-1 ou MEI-2 seul n'en est pas capable. Ce résultat suggère fortement qu'il existe plusieurs interactions de la Katanine^{MEI-1•MEI-2} avec les microtubules via les sous-unités MEI-2. Cela permettrait un rapprochement de plusieurs microtubules sous forme d'un faisceau (McNally et al., 2014; Joly et al., 2016). Cependant, le nombre d'interactions Katanine^{MEI-1•MEI-2}•microtubule

nécessaire à la coupure des microtubules n'a pas encore été déterminé. La cible moléculaire reconnue par l'enzyme pour interagir directement avec le microtubule et le couper n'a pas non plus été identifiée. Deux études génétiques chez *C. elegans* ont permis l'identification de deux mutations de la tubuline α *tba-2*(*sb27*) et la tubuline β *tbb-2*(*sb26*) affectant l'activité de l'enzyme (Lu et al., 2004; Lu and Mains, 2005). Les auteurs démontrent ainsi un lien génétique direct entre *tba-2*, *tbb-2* et *mei-1*, *mei-2*. Ils suggèrent fortement que les mutations E194K dans le corps globulaire de la tubuline α et E439K sur la queue C-terminale de la tubuline β affectent l'interaction directe entre la Katanine^{MEI-1•MEI-2} et les microtubules, essentielle à l'activité de coupure des microtubules. Toutefois, aucune interaction protéique directe n'a encore été caractérisée.

Un des avantages d'utiliser la Katanine comme modèle d'étude est de pouvoir dissocier les fonctions de l'enzyme selon la sous-unité qui assure la fonction donnée. Ici, l'étude de l'interaction de la Katanine^{MEI-1•MEI-2} avec les microtubules peut se réaliser uniquement avec MEI-2 et les microtubules pour simplifier le système. De la même façon, l'activité d'hydrolyse de l'ATP qui est assurée par MEI-1 peut être étudiée en présence ou en absence de MEI-2. Il est ainsi possible de replacer les résultats dans un contexte de la Katanine^{MEI-1•MEI-2} entière qui est plus complexe, mais plus physiologique.

Chez *C. elegans*, la Katanine^{MEI-1•MEI-2} est essentielle à la méiose femelle, et plus particulièrement, elle est requise pour l'assemblage du fuseau méiotique (Joly et al., 2016; McNally et al., 2006; Srayko et al., 2000; Srayko et al., 2006). Chacune des deux sous-unités MEI-1 et MEI-2 est localisée sur les pôles du fuseau méiotique ainsi que sur les chromosomes au cours de la division méiotique (**Figure 19**) (Clark-Maguire and Mains, 1994b; Srayko et al., 2000; McNally et al., 2006; McNally et al., 2014; Joly et al., 2016). Durant l'anaphase, MEI-1 et MEI-2 sont localisées sur les microtubules au centre du fuseau et sur les chromosomes. Le complexe enzymatique participe ainsi activement à l'assemblage d'un fuseau fonctionnel qui permet une ségrégation correcte des chromosomes entre le globule polaire et le cytoplasme de l'ovocyte fécondé. Lors d'un défaut d'organisation du fuseau méiotique, la mauvaise ségrégation des chromosomes se traduit par une aneuploïdie des embryons et la formation de gros globules polaires observés chez des mutants de *mei-1* et *mei-2* (Mains et al., 1990a).

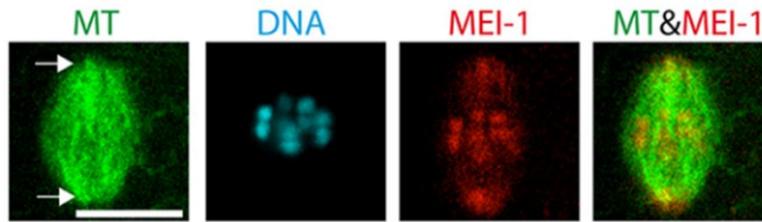


Figure 19 : Localisation de MEI-1 sur le fuseau méiotique femelle chez *C. elegans*. Immunomarquage des microtubules (vert) et de MEI-1 (rouge) sur le fuseau d'un embryon méiotique fixé en métaphase. Les chromosomes sont marqués au DAPI (bleu). MEI-1 est localisé sur les chromosomes et le fuseau méiotique femelle avec un enrichissement au niveau des pôles du fuseau. Figure extraite de [Joly et al., 2016](#).

Comment la Katanine est-elle capable d'assembler un fuseau méiotique en coupant les microtubules ?

Le rôle mécanistique de la Katanine^{MEI-1•MEI-2} sur l'assemblage et la dynamique du fuseau au cours de la méiose n'a pas encore entièrement été déchiffré, mais certains points ont été mis en évidence. La localisation spécifique de la Katanine^{MEI-1•MEI-2} au niveau des pôles du fuseau (**Figure 19**) pourrait participer à l'orientation des microtubules pour assembler un fuseau bipolaire (**Figure 15**). La Katanine contrôle le nombre de pôles formés dans le fuseau notamment en « coopération » avec ASPM-1, qui est un partenaire protéique essentiel pour la bipolarité du fuseau ([McNally and McNally, 2011](#); [McNally et al., 2014](#)). L'activité de coupure des microtubules par la Katanine^{MEI-1•MEI-2} permet d'augmenter rapidement le nombre de microtubules courts et dynamiques dans un espace restreint ([McNally et al., 2006](#); [Roll-Mecak and Vale, 2006](#); [Srayko et al., 2006](#)). En effet, l'analyse par tomographie électronique d'un fuseau méiotique montre que celui-ci est composé majoritairement de microtubules courts ([Lantzsch et al., 2021](#); [Srayko et al., 2006](#)). Cela facilite sûrement une réorganisation et une dynamique plus efficace du réseau, notamment au cours de la transition métaphase-anaphase. En effet, des mutations de MEI-1 ou de MEI-2 affectant légèrement l'activité de la Katanine^{MEI-1•MEI-2} conduisent à la formation de longs fuseaux méiotiques et la persistance de pôles ([McNally et al., 2006](#)). Lors de cette transition métaphase-anaphase, le fuseau se raccourcit, le nombre et la longueur des microtubules réduisent ([Lantzsch et al., 2021](#)). Ces caractéristiques dépendent aussi de l'activité de la Katanine^{MEI-1•MEI-2}. En réduisant légèrement l'activité de la Katanine^{MEI-1•MEI-2}, les auteurs démontrent que, bien que le fuseau bipolaire ne soit pas parfaitement formé, les microtubules sont plus longs et plus stables. Les microtubules seraient stabilisés par leur interaction avec les chromosomes en absence de l'activité de la Katanine^{MEI-1•MEI-2}. Les auteurs suggèrent que la Katanine^{MEI-1•MEI-2} est requise pour réaliser cette transition métaphase-anaphase, ce qui est cohérent avec sa localisation sur les chromosomes ([Lantzsch et al., 2021](#)). De plus, la rotation du fuseau à cette transition est dépendante de l'activité de la Katanine. Ces résultats soulèvent l'importance d'une fine régulation de la présence et de l'activité de la Katanine^{MEI-1•MEI-2} dans l'espace et le temps au cours de la méiose.

C. L'activité de la Katanine^{MEI-1•MEI-2} est régulée au cours du développement embryonnaire

L'activité de la Katanine^{MEI-1•MEI-2} est essentielle au bon fonctionnement de la méiose femelle chez *C. elegans* puisqu'elle participe activement à l'assemblage du fuseau méiotique. Cependant, il a été montré qu'un maintien de cette activité enzymatique au cours de la première mitose de l'embryon affecte drastiquement la dynamique du fuseau mitotique et entraîne de la létalité embryonnaire (Clark-Maguire and Mains, 1994a; Kurz et al., 2002; Pintard et al., 2003a; Pintard et al., 2003b; Müller-Reichert et al., 2010). En effet, cela a été démontré tout d'abord génétiquement à l'aide du mutant *gain de fonction mei-1(ct46)* qui produit la protéine MEI-1 P99L (Mains et al., 1990a; Clandinin and Mains, 1993). Les embryons *mei-1(ct46)* présentent un fuseau mitotique plus court car les centrosomes sont plus proches l'un de l'autre. Le fuseau est mal orienté et positionné en postérieur de l'embryon. Chez ce mutant, MEI-1 P99L s'accumule précisément sur le fuseau mitotique, et en particulier sur les centrosomes et sur les chromosomes (Clark-Maguire and Mains, 1994b; Pintard et al., 2003b). La coupure des microtubules par la Katanine^{MEI-1•MEI-2} au cours de la mitose est donc toxique pour la dynamique du fuseau mitotique. Une voie de régulation de l'activité de la Katanine est donc indispensable pour le fonctionnement de cette transition méiose-mitose et le développement embryonnaire. Plusieurs acteurs impliqués dans cette régulation ont déjà été identifiés (**Figure 21**).

i. Voie de régulation par le système ubiquitine-protéasome

Une voie de régulation de l'activité de la Katanine^{MEI-1•MEI-2} au cours de la transition méiose-mitose se met en place par le contrôle de sa présence. A la fin de la méiose, la sous-unité MEI-1 est ubiquitinylée par le système E3-ubiquitine-ligase contenant CUL-3 (Cullin 3) pour être envoyée à la dégradation par le protéasome 26S (**Figure 20**) (Clark-Maguire and Mains, 1994a; Kurz et al., 2002; Pintard et al., 2003a; Furukawa et al., 2003; Xu et al., 2003). Afin de déterminer l'adaptateur de CUL-3 pour interagir avec la sous-unité MEI-1, une approche génétique a permis d'identifier le gène *mel-26* (Maternal Effect Lethal 26) comme régulateur de la dégradation de Katanine^{MEI-1•MEI-2} à la transition méiose-mitose (Clark-Maguire and Mains, 1994b; Dow and Mains, 1998; Pintard et al., 2003b). MEL-26 interagit directement avec MEI-1 (Pintard et al., 2003; Gomes et al., 2013) et permet d'adapter le système E3-ubiquitine-ligase, en interagissant via son domaine BTB avec CUL-3 (**Figure 20**) (Pintard et al., 2003; Pintard et al., 2004).

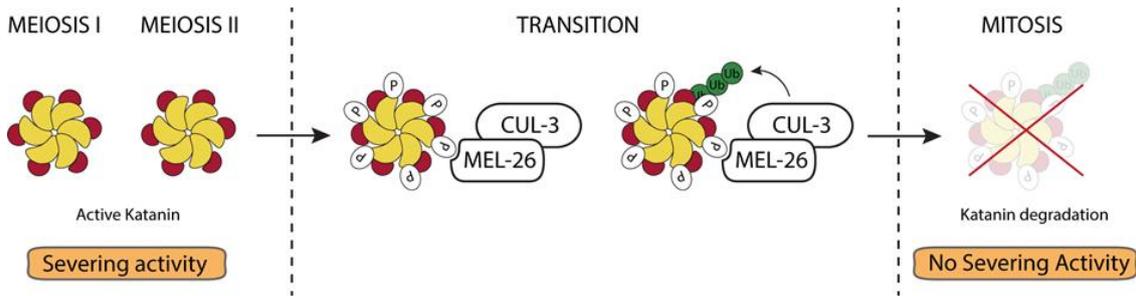


Figure 20 : Régulation de l'activité de la Katanine^{MEI-1•MEI-2} au cours de la transition méiose-mitose par envoi à la dégradation. La Katanine^{MEI-1•MEI-2} active en méiose est ciblée par le complexe E3 ubiquitine ligase. CUL-3 interagit avec la Katanine^{MEI-1•MEI-2} via son adaptateur MEL-26 pour ubiquitinyler la Katanine^{MEI-1•MEI-2} et l'envoyer à la dégradation par le protéasome pour le bon fonctionnement de la première mitose.

Chez le mutant de *mei-1(ct46)* (*gain de fonction*), la mutation P99L de MEI-1 montre une « résistance » à son envoi à la dégradation. En effet, cette mutation est localisée dans une séquence PEST qui contribue à l'envoi à la dégradation des protéines de courte durée de vie. Il est aussi démontré que l'interaction entre MEL-26 et MEI-1 P99L est défectueuse en double hybride (Pintard et al., 2003b).

ii. Voie de régulation par phosphorylation

MBK-2 (Mini Brain Kinase 2) est un autre acteur de la régulation de la Katanine^{MEI-1•MEI-2} qui a été identifié chez *C. elegans*. MBK-2 est une kinase de la famille des kinases DYRK (Dual-specificity tyrosine phosphorylation-Regulated Kinase) qui phosphoryle spécifiquement les tyrosines, mais aussi les serines et thréonines de leur substrat. Ces kinases doivent être phosphorylées sur un motif YxY pour être actives (Soppa and Becker, 2015).

La présence et l'activité de la Kinase MBK-2 à la fin de la méiose contribue activement à la voie de dégradation de MEI-1 pour permettre une correcte transition méiose-mitose. En effet, il a été montré que des mutants *perte de fonction* de *mbk-2* affectent le positionnement, la longueur et la dynamique du fuseau mitotique. Ces caractéristiques phénotypiques sont très similaires à celles observées chez le mutant « gain de fonction » de *mei-1*. De plus, un défaut d'activité de MBK-2 conduit à un maintien de la présence de MEI-1 sur le fuseau mitotique (Pellettieri et al., 2003; Quintin et al., 2003; Ming Pang et al., 2004). MBK-2 agit donc comme un régulateur négatif (inhibiteur) de l'activité de la Katanine^{MEI-1•MEI-2} à la transition méiose-mitose.

Après la fécondation de l'ovocyte par le spermatozoïde, MBK-2, qui est localisée au cortex de l'ovocyte, doit être activée pour cibler le complexe Katanine^{MEI-1•MEI-2}. Cdk-1 (Cyclin Dependant Kinase 1) phosphoryle MBK-2 pour rendre la kinase active, puis le complexe EGG-3 et EGG-4/5 qui séquestre

MBK-2 au cortex s'internalise dans le cytoplasme de l'ovocyte en méiose II où ils seront dégradés par le complexe APC (Anaphase Promoting-Complex) (Stitzel et al., 2007; Cheng et al., 2009). MBK-2 devient ainsi libre de phosphoryler MEI-1 sur le fuseau méiotique. MBK-2 phosphoryle précisément la serine 92 de MEI-1 à partir de l'anaphase de la méiose II conduisant à sa dégradation pour le bon fonctionnement de la première mitose de l'embryon (**Figure 21**) (Stitzel et al., 2006).

iii. Lien direct entre la voie de régulation par dégradation et par phosphorylation

Deux voies de régulation de la Katanine^{MEI-1•MEI-2} au cours de la transition méiose-mitose chez *C. elegans* ont été identifiées et partiellement décrites de façon indépendante dans la littérature. La première est la voie par envoi à la dégradation de MEI-1 via le système ubiquitine protéasome et la seconde via la phosphorylation de MEI-1 S92 par MBK-2. *Mais existe-il un lien direct entre ces deux voies de régulation ?* Il a été mentionné précédemment que MEL-26 interagit directement avec MEI-1 en double hybride (Pintard et al., 2003; Gomes et al., 2013). Cette interaction spécifique est perdue lorsque le résidu S92 de MEI-1 est muté en alanine (acide aminé non phosphorylable) alors que celle-ci est maintenue lorsque S92 est mutée en aspartate, mimant la phosphorylation du résidu (Gomes et al., 2013). L'interaction MEL-26•MEI-1 est strictement dépendante de l'état de phosphorylation de la serine 92 de MEI-1. La phosphorylation de MEI-1 par MBK-2 permet donc l'envoi à la dégradation de MEI-1 via le système ubiquitine-protéasome au cours de la transition méiose-mitose (**Figure 21**) (Stitzel et al., 2006).

iv. Voie de régulation par déphosphorylation

Bien que la voie de régulation de l'activité de la Katanine^{MEI-1•MEI-2} par phosphorylation de MEI-1 ne soit pas entièrement déchiffrée, une voie de régulation par la déphosphorylation de la Katanine^{MEI-1•MEI-2} émerge.

Han et al. (2009) démontre génétiquement chez *C. elegans* que l'inactivation du complexe PP4^{PPFR-1} (Protein Phosphatase 4), contenant la sous-unité catalytique PPH-4.1 et la sous-unité régulatrice PPFR-1 (Protein Phosphatase Four Regulatory subunit 1), supprime le phénotype d'inactivation de *mel-26* et de *mei-1(ct46)* correspondant tous deux à une accumulation de la Katanine^{MEI-1•MEI-2} active en mitose. La phosphatase PP4^{PPFR-1} semble donc agir comme un régulateur positif de l'activité de la Katanine^{MEI-1•MEI-2} puisqu'en son absence, l'activité ectopique de la Katanine^{MEI-1•MEI-2} est réduite en mitose. De plus, Gomes et al. (2013) décrivent que l'inactivation de *ppfr-1* amplifie le phénotype d'un mutant de *mei-1* au cours de la méiose. Ce mutant *mei-1(ts)* est caractérisé par un allongement de la longueur du fuseau méiotique causant une augmentation du

volume du second globule polaire. Ce résultat confirme que la phosphatase PP4^{PPFR-1} est un régulateur positif de la Katanine^{MEI-1•MEI-2}, et ce, dès le début de la méiose (Han et al., 2009; Gomes et al., 2013). En effet, il a aussi été montré que PP4^{PPFR-1} modifie le profil de phosphorylation de MEI-1 *in vivo* sur gel 2D (Gomes et al., 2013). Afin d'activer le complexe enzymatique Katanine^{MEI-1•MEI-2} en méiose, la phosphatase PP4^{PPFR-1} ciblerait donc directement la sous-unité catalytique MEI-1 (Figure 21). Cependant, les résidus de MEI-1 ciblés par la phosphatase n'ont pas encore été identifiés.

D'autre part, PPFR-1 interagit directement avec MEL-26 par double hybride. Une inhibition de *mel-26* chez *C. elegans* conduit à une accumulation de PPFR-1 aux centrosomes en mitose, qui est caractéristique de la localisation de MEI-1 chez le mutant *mei-1(ct46)* (Gomes et al., 2013). MEL-26 serait donc un inhibiteur de la phosphatase PP4^{PPFR-1} au cours de la mitose. Le système E3 Ubiquitine-ligase CUL-3^{MEL-26} cible directement la Katanine^{MEI-1•MEI-2} via la sous-unité catalytique MEI-1 pour l'envoyer à la dégradation, mais cible aussi l'activateur de la Katanine^{MEI-1•MEI-2} qui est la phosphatase PP4^{PPFR-1} au cours de la transition méiose-mitose.

A partir de toutes les données de la littérature, voici une hypothèse du mécanisme de régulation de la Katanine^{MEI-1•MEI-2} au cours de la transition méiose-mitose chez *C. elegans*. MBK-2 est activé au cours de la méiose II et commence à phosphoryler MEI-1 sur le second fuseau méiotique en anaphase. Cependant, la présence de PP4^{PPFR-1} en méiose I et méiose II pourrait déphosphoryler le(s) site(s) de MEI-1 phosphorylé(s) par MBK-2, pour laisser la Katanine^{MEI-1•MEI-2} active jusqu'à la fin de la méiose II. La Katanine^{MEI-1•MEI-2} serait en équilibre entre phosphorylations et déphosphorylations. A la fin de la méiose II, MEL-26 cible (i) MEI-1 phosphorylé par MBK-2 et (ii) PPFR-1, la sous-unité régulatrice de la phosphatase PPA^{PPFR-1} pour démarrer leur envoi à la dégradation par le protéasome. La quantité de la Katanine^{MEI-1•MEI-2} active se réduit très rapidement permet une transition vers la mitose. Cela suggère qu'un cycle de phosphorylations et de déphosphorylations peut moduler finement dans l'espace et dans le temps l'activité de coupure des microtubules par la Katanine^{MEI-1•MEI-2} en jouant sur la quantité d'enzyme active disponible.

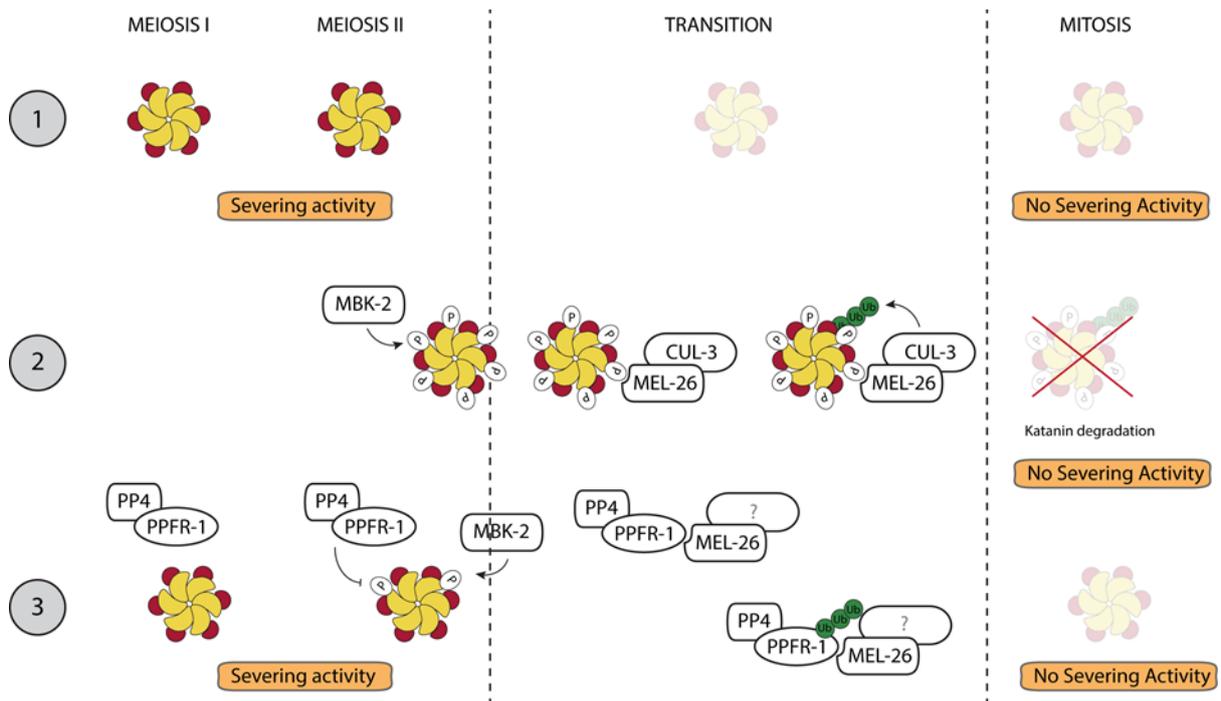


Figure 21 : Représentation schématique des voies de régulation de l'activité de la Katanine^{MEI-1•MEI-2} à la transition méiose-mitose. (1) L'activité de la Katanine^{MEI-1•MEI-2} est requise au cours de la méiose et doit être contrôlée et limitée pour le bon fonctionnement de la première mitose. **(2)** La kinase MBK-2 phosphoryle MEI-1 à la fin de la méiose II. MEL-26 peut ainsi interagir avec MEI-1 pour adapter le système E3-ubiquitine ligase. Une fois MEI-1 ubiquitinylée, la Katanine^{MEI-1•MEI-2} est envoyée à la dégradation par le protéasome. **(3)** La phosphatase PP4^{PPFR-1} modifie le profil de phosphorylation de MEI-1 en méiose. Elle pourrait alors déphosphoryler MEI-1 pour laisser actif le complexe durant la méiose en contrant le début de phosphorylation par MBK-2. De plus, MEL-26 interagit avec PPFR-1 à la fin de la méiose pour probablement l'envoyer à la dégradation en parallèle de la Katanine^{MEI-1•MEI-2}.

La déphosphorylation de MEI-1 par PP4 rend la Katanine^{MEI-1•MEI-2} active en méiose, mais est-ce que la phosphorylation de MEI-1 par MBK-2 pourrait inhiber l'activité du complexe enzymatique en plus de participer à son envoi à la dégradation ? Aucune étude n'a révélé de données confirmant cette hypothèse chez *C. elegans*. Toutefois, chez *Xenopus Laevis*, la phosphorylation de la serine 131 de p60 a été décrite comme réduisant l'activité ATPase de la Katanine stimulée par les microtubules et la coupure des microtubules (Loughlin et al., 2011; Whitehead et al., 2013). Le site phosphorylé régule spécifiquement l'activité du complexe enzymatique, sans modifier l'interaction primaire avec les microtubules. Les auteurs proposent que ce résidu, une fois phosphorylé, pourrait modifier l'état d'hexamérisation de la Katanine, car l'effet de la mutation de ce site est restauré en augmentant la concentration d'enzyme (Whitehead et al., 2013).

IV. Questions et objectifs de la thèse :

Les MSE sont des acteurs principaux de la régulation du réseau de microtubules, et ce, dans divers types cellulaires. En modifiant la longueur, la dynamique, le nombre et l'organisation des microtubules dans l'espace, ces enzymes sont capables de les réorganiser de manière rapide et efficace en un réseau fonctionnel. Ainsi en développant toutes les connaissances sur leur mécanisme d'action, nous serons en mesure de comprendre comment leur activité peut être régulée au cours d'un mécanisme cellulaire donné, et comment une suractivité enzymatique retrouvée dans un contexte pathologique pourrait être modulée dans un but thérapeutique.

Ma thèse vise ainsi à comprendre comment l'activité de la Katanine^{MEI-1•MEI-2} peut être régulée dans l'espace et le temps au cours du développement embryonnaire chez *C. elegans*. Dans un premier temps, nous avons **développé un système biologique à partir duquel nous sommes capables de suivre la localisation de la Katanine^{MEI-1•MEI-2} dans le ver entier d'une part, mais aussi de suivre son activité enzymatique au cours de la méiose femelle et du développement embryonnaire.**

A. Régulation de l'activité de la Katanine^{MEI-1•MEI-2} par phosphorylations

L'action de la Katanine^{MEI-1•MEI-2} en méiose chez *C. elegans* permet l'assemblage successif de deux fuseaux méiotiques dynamiques acentrosomaux et essentiels à la ségrégation des chromosomes. Cependant, cette même activité enzymatique au cours de la mitose dans le zygote est délétère pour la dynamique du fuseau et létale pour le développement embryonnaire. Il existe donc une fine régulation de la quantité de la Katanine^{MEI-1•MEI-2} active au cours de la transition méiose-mitose. Le complexe enzymatique est ciblé par le système CUL-3^{MEL-26} qui permet son envoi à la dégradation par le protéasome. Par ailleurs, la kinase MBK-2 phosphoryle la sous-unité MEI-1 sur la serine 92 à la fin de la méiose II et participe à son envoi à la dégradation. En parallèle, la phosphatase PP4^{PPFR-1} modifie le profil de phosphorylation de MEI-1, et est caractérisée comme régulateur positif de l'activité de la Katanine^{MEI-1•MEI-2} en méiose. La régulation de l'activité de l'enzyme semble osciller entre phosphorylations et déphosphorylations. De plus, il a été démontré chez *Xenopus Laevis* que la phosphorylation d'un résidu contribue à une inhibition de l'activité de la Katanine (Whitehead et al., 2013). Au cours de ma thèse, je souhaite répondre aux questions suivantes : d'une part, **la phosphorylation de MEI-1 par MBK-2 pourrait-elle inhiber l'activité enzymatique de la Katanine^{MEI-1•MEI-2} ?** D'autre part, **cette phosphorylation est-elle suffisante pour envoyer la Katanine^{MEI-1•MEI-2} à la dégradation ?**

B. Régulation de l'activité de la Katanine^{MEI-1•MEI-2} via son interaction avec le microtubule

Le complexe enzymatique Katanine étant composé de deux sous-unités essentielles à son activité de coupure des microtubules, dispose d'une sous-unité catalytique et une sous-unité régulatrice. Le rôle et le fonctionnement de la sous-unité catalytique est aujourd'hui de plus en plus décrit, mais pourtant la fonction de la sous-unité régulatrice n'est pas encore bien connue. Le rôle critique de certaines sous-unités régulatrices est l'interaction de l'enzyme avec son substrat. Leur spécificité d'interaction avec les microtubules pourrait donc être un moyen subtil et efficace pour contrôler et réguler l'activité de coupure des microtubules par la Katanine. Cette première interaction avec le microtubule via la sous-unité régulatrice permettrait la mise en place de l'enzyme active à la surface du microtubule qui serait essentielle pour, dans un second temps, l'extraction de la tubuline du microtubule via les sous-unités catalytiques entraînant par la suite la coupure du microtubule.

L'un des principaux objectifs de ma thèse est d'**identifier les déterminants moléculaires de la sous-unité régulatrice MEI-2 requis pour l'interaction directe de la Katanine^{MEI-1•MEI-2} avec les microtubules chez *C. elegans*, qui est essentielle à l'activité de la Katanine^{MEI-1•MEI-2} au cours de la méiose femelle.** L'accessibilité de l'enzyme à son substrat peut être favorisée ou limitée par l'affinité de son interaction. *Comment ces déterminants moléculaires sont-ils capables de moduler l'activité de l'enzyme ?* L'objectif suivant est donc de **caractériser l'effet de mutations de ces résidus sur l'activité de la Katanine^{MEI-1•MEI-2} *in vivo*.** Selon la nature de la mutation, et par conséquent l'affinité de la Katanine pour le microtubule, *sommes-nous capables de nuancer l'activité de l'enzyme dans un contexte cellulaire fonctionnel ?*

De plus, pour comprendre la contribution générale de l'interaction enzyme-substrat sur l'activité de coupure des microtubules par la Katanine, un des objectifs de la thèse est **d'identifier la cible de la Katanine^{MEI-1•MEI-2} sur la surface du microtubule.** *La Katanine^{MEI-1•MEI-2} est-elle capable de reconnaître un motif spécifique sur la surface du microtubule pour interagir avec et entraîner sa coupure ?*

Résultats

Phosphorylation of the microtubule-severing AAA+ enzyme Katanin regulates *C. elegans* embryo development

Joly N., Beaumale E., Van Hove L., Martino L. and Pintard L. (2020) *Journal of Cell Biology*.
<https://doi.org/10.1083/jcb.201912037>

La Katanine est une enzyme de coupure des microtubules, qui est essentielle pour l'assemblage du fuseau méiotique femelle chez *C. elegans*. Cependant, le maintien de son activité au cours de la première mitose affecte drastiquement la dynamique du fuseau mitotique et est toxique pour le développement embryonnaire. La Katanine est ciblée par le complexe CUL-3^{MEL-26} pour être envoyée à la dégradation par le protéasome à la transition méiose-mitose. De plus, la Katanine est phosphorylée par la kinase MBK-2 à la fin de la méiose II. Cette étude vise à comprendre comment l'activité de la Katanine est régulée par phosphorylations au cours de cette transition méiose-mitose.

En analysant la totalité du ver, nous avons montré que la Katanine est localisée de façon abondante dans le cytoplasme des ovocytes. Même si la quantité de la Katanine est fortement réduite après la méiose dans l'embryon, une quantité non négligeable de Katanine est maintenue sur les centrosomes et chromosomes durant les premières mitoses, et ce, au cours du développement embryonnaire.

Nous avons aussi montré que MBK-2 phosphoryle les deux sous-unités de la Katanine sur plusieurs sites. La phosphorylation d'un seul de ces résidus est nécessaire et suffisante à l'envoi de la Katanine à la dégradation en permettant une interaction directe de ce résidu phosphorylé avec l'adaptateur du complexe CUL-3^{MEL-26}. Des approches biochimiques nous ont permis de prouver que les phosphorylations de la Katanine inhibent aussi son activité ATPase en réponse aux microtubules.

Cette étude met en lumière un mode de régulation complexe, basé sur des cycles de phosphorylation/déphosphorylation de la Katanine au cours de la transition méiose-mitose, en agissant directement sur l'activité intrinsèque de l'enzyme et diminuant la quantité disponible. Cela permet un contrôle rapide et efficace de l'activité de coupure des microtubules par la Katanine.

*Dans cette étude, ma contribution a été la caractérisation de la souche du nématode *C. elegans* exprimant sGFP::MEI-2 présentée dans la Figure 1 et la Figure S1. Ce travail a consisté à définir la localisation de sGFP::MEI-2 dans le ver entier, mais aussi plus spécifiquement au cours de la méiose et de la mitose dans des embryons disséqués, à l'aide d'un microscope Spinning Disk. J'ai contrôlé la viabilité des vers à différentes températures de culture. Après exposition des vers à un ARNi dirigé spécifiquement contre mei-1 ou mei-2, j'ai caractérisé l'expression des sous-unités MEI-1 et MEI-2 par microscopie ou par western blot puis évalué la viabilité des vers. J'ai analysé l'ensemble de ces résultats et assemblé les figures correspondantes.*

ARTICLE

Phosphorylation of the microtubule-severing AAA+ enzyme Katanin regulates *C. elegans* embryo development

Nicolas Joly¹, Eva Beaumale, Lucie Van Hove, Lisa Martino, and Lionel Pintard¹

The evolutionarily conserved microtubule (MT)-severing AAA-ATPase enzyme Katanin is emerging as a critical regulator of MT dynamics. In *Caenorhabditis elegans*, Katanin MT-severing activity is essential for meiotic spindle assembly but is toxic for the mitotic spindle. Here we analyzed Katanin dynamics in *C. elegans* and deciphered the role of Katanin phosphorylation in the regulation of its activity and stability. Katanin is abundant in oocytes, and its levels drop after meiosis, but unexpectedly, a significant fraction is present throughout embryogenesis, where it is dynamically recruited to the centrosomes and chromosomes during mitosis. We show that the minibrain kinase MBK-2, which is activated during meiosis, phosphorylates Katanin at multiple serines. We demonstrate unequivocally that Katanin phosphorylation at a single residue is necessary and sufficient to target Katanin for proteasomal degradation after meiosis, whereas phosphorylation at the other sites only inhibits Katanin ATPase activity stimulated by MTs. Our findings suggest that cycles of phosphorylation and dephosphorylation fine-tune Katanin level and activity to deliver the appropriate MT-severing activity during development.

Introduction

The active remodeling of the microtubule (MT) cytoskeleton is instrumental for multiple dynamic cellular processes. MT-Severing Enzymes (MSEs), which include Katanin, Fidgetin, and Spastin, are emerging as an important class of evolutionarily conserved MT remodelers, with critical functions in the regulation of MT dynamics in diverse cellular and biological contexts (McNally and Roll-Mecak, 2018; Sharp and Ross, 2012). Instead of regulating MT dynamics by interacting with the plus or minus ends of MTs, these enzymes interact with the MT lattice and might facilitate the extraction of tubulin dimers, eventually leading to MT severing (Vemu et al., 2018; Zehr et al., 2020). Depending on the amount of GTP-tubulin available, these severing events, leading to the formation of new MT extremities, can be used as seeds for the nucleation of new MTs or can induce the rapid depolymerization of MTs (Kuo et al., 2019; Roll-Mecak and Vale, 2006; Vemu et al., 2018). Despite considerable progress in deciphering the function of these enzymes, how these molecular machines are regulated in space and time to deliver the adequate level of MT-severing activity remains poorly understood.

The nematode *Caenorhabditis elegans* provides a dynamic developmental context for the study of Katanin function and regulation during meiotic and mitotic cell divisions (Bowerman

and Kurz, 2006; DeRenzo and Seydoux, 2004; Pintard and Bowerman, 2019). In *C. elegans*, the *mei-1* and *mei-2* genes (meiosis defective 1 and 2), which encode the catalytic (p60, -ATPases Associated with diverse cellular Activities [AAA ATPase]) and regulatory (p80-like) subunits, respectively, of Katanin, are essential for meiotic spindle assembly (Mains et al., 1990; McNally and Vale, 1993; Roll-Mecak and McNally, 2010; Sharp and Ross, 2012; Srayko et al., 2000). Katanin MT-severing activity is required to produce seeds for the MT nucleation essential for meiotic spindle formation (Joly et al., 2016; Srayko et al., 2006). Katanin also keeps the meiotic spindles short, triggers the anaphase shortening of the spindle, and severs MTs between the polar bodies and the female pronucleus during meiosis II (Gomes et al., 2013; McNally et al., 2006). While essential for meiosis, Katanin must be rapidly inactivated before the first mitotic division (Clark-Maguire and Mains, 1994). Failure to down-regulate Katanin in mitosis results in embryonic lethality, presumably as a consequence of inappropriate MT severing during the early mitotic divisions (Clark-Maguire and Mains, 1994; Kurz et al., 2002; Müller-Reichert et al., 2010; Pintard et al., 2003a,b). Over the past two decades, significant progress has been made in identifying the pathways responsible

Programme Equipes Labellisées Ligue contre le Cancer – Team “Cell Cycle and Development,” Centre National de la Recherche Scientifique – UMR7592, Institut Jacques Monod/University of Paris, Paris, France.

Correspondence to Nicolas Joly: nicolas.joly@ijm.fr; Lionel Pintard: lionel.pintard@ijm.fr.

© 2020 Joly et al. This article is distributed under the terms of an Attribution-Noncommercial-Share Alike-No Mirror Sites license for the first six months after the publication date (see <http://www.rupress.org/terms/>). After six months it is available under a Creative Commons License (Attribution-Noncommercial-Share Alike 4.0 International license, as described at <https://creativecommons.org/licenses/by-nc-sa/4.0/>).

Rockefeller University Press

J. Cell Biol. 2020 Vol. 219 No. 6 e201912037



<https://doi.org/10.1083/jcb.201912037>

1 of 15

Downloaded from https://rupress.org/jcb/article-pdf/219/6/201912037/1044138/jcb.201912037.pdf by guest on 20 July 2020

for Katanin down-regulation after meiosis. First, an E3 ubiquitin ligase nucleated by Gullin 3 (CUL-3) and using the substrate adaptor protein Maternal Effect Lethal 26 (MEL-26; Dow and Mains, 1998) triggers MEIosis defective 1 (MEI-1) ubiquitylation and its subsequent degradation by the 26S proteasome (Furukawa et al., 2003; Pintard et al., 2003b; Xu et al., 2003). Second, MiniBrain Kinase 2 (MBK-2), a member of the Dual-specificity and tyrosine (Y)-Regulated Kinase (DYRK) family of protein kinases, which is specifically activated during female meiosis to orchestrate the oocyte-to-embryo transition (Cheng et al., 2009), contributes to MEI-1 degradation after meiosis (Pellettieri et al., 2003; Quintin et al., 2003; Stitzel et al., 2006, 2007). However, whether MBK-2 is directly required for MEI-1 degradation by the CRL3^{MEL-26} E3 ligase or acts in a parallel degradation pathway with an unknown ubiquitin ligase is still unclear (Beard et al., 2016; Lu and Mains, 2007). Reducing *mbk-2* function enhances the incomplete lethality of *mel-26(null)* at 15°C, arguing that MEL-26 acts in parallel to MBK-2 (Lu and Mains, 2007). Alternatively, MBK-2 might regulate both Katanin activity and stability, which could also explain this genetic interaction. Additional layers of Katanin regulation involve a Protein Phosphatase 4 (PP4) complex, using Protein Phosphatase Four Regulatory subunit 1 (PPFR-1) as a regulatory subunit (henceforth PP4^{PPFR-1}), which genetically acts as an activator of Katanin during meiosis (Gomes et al., 2013; Han et al., 2009). Consistent with kinases and phosphatases regulating Katanin activity and/or stability, MEI-1 exhibits a complex phosphorylation pattern by 2D gel analysis, and this pattern is altered upon inactivation of the PP4^{PPFR-1} phosphatase complex (Gomes et al., 2013). Finally, postmeiotic Katanin down-regulation has been shown to involve inhibition of *mei-1* mRNA translation (Li et al., 2009).

In summary, the current view is that Katanin is eliminated after meiosis (Bowerman and Kurz, 2006; DeRenzo and Seydoux, 2004; Verilhac et al., 2010) and therefore does not participate in mitosis. Here we revise this model and show, using an endogenously tagged GFP line generated by CRISPR/Cas9, that Katanin is readily expressed during embryogenesis, where it is actively recruited to the centrosomes and chromosomes during mitosis. To understand how Katanin is tolerated during mitosis, we investigated the precise role of MEI-1 phosphorylation in the regulation of Katanin activity and stability. By combining biochemical approaches with structure-function analysis in vivo, we show that MBK-2 phosphorylates MEI-1 and MEI-2 at multiple residues to inhibit MT-stimulated ATPase Katanin activity. In addition, we demonstrate unequivocally that phosphorylation of MEI-1 by MBK-2 at a single serine (S92) is both necessary and sufficient to target MEI-1 for degradation after meiosis but probably also during mitosis. Overall, our findings suggest that Katanin stability and activity is finely tuned by cycles of phosphorylation and dephosphorylation to deliver the adequate level of MT-severing activity at the right time and place during *C. elegans* development.

Results

Spatiotemporal analysis of Katanin dynamics during *C. elegans* development

The analysis of Katanin dynamics in *C. elegans* has so far been limited to the analysis of a strain generated by microparticle

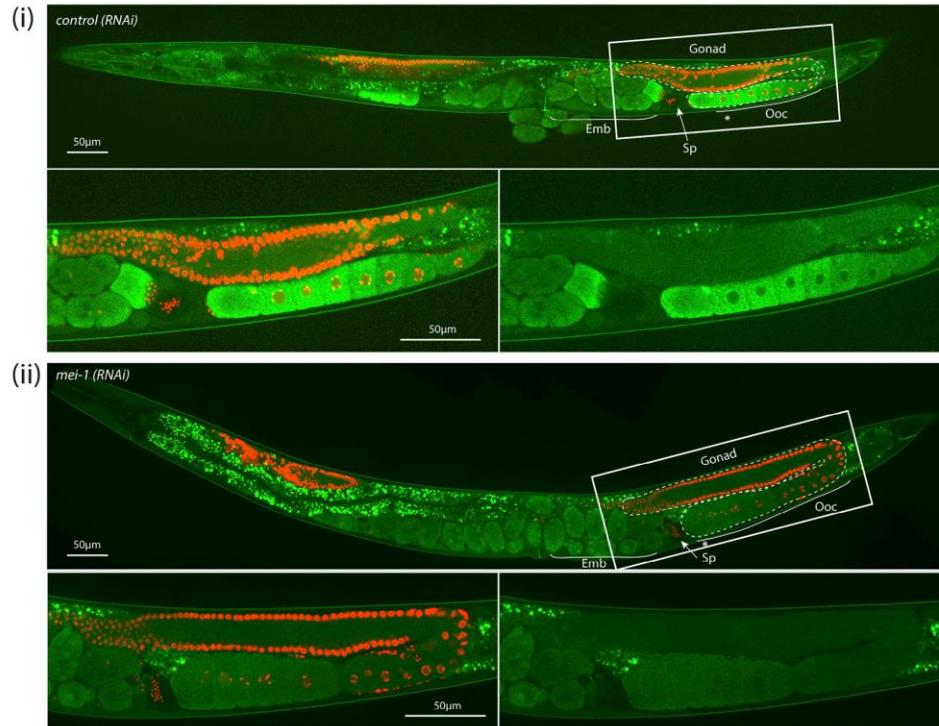
bombardment expressing a nonfunctional GFP::MEI-1 version driven by the germline-specific promoter *pie-1* (McNally et al., 2006; Pellettieri et al., 2003; Pintard et al., 2003a; Stitzel et al., 2006). To visualize the spatiotemporal expression of a functional *C. elegans* Katanin by live-imaging approaches, we generated a superfolder GFP (sGFP) knock-in *mei-2* allele (sGFP::*mei-2*) using the CRISPR/Cas9 system (Materials and methods; Fig. S1, A and B). Embryos expressing sGFP::MEI-2 were fully viable (100%, $n > 200$, $n = 4$; Fig. S1 C), indicating that the sGFP tag does not interfere with the essential function of Katanin. Western blot experiments using GFP antibodies confirmed the production of sGFP::MEI-2 at the expected size (Fig. S1 B). Using a similar approach, we tried to generate sGFP knock-in *mei-1* allele, but we did not recover any viable homozygous strains, indicating that the sGFP tag alters MEI-1 function, consistent with previous observations (Beard et al., 2016; Joly et al., 2016).

To visualize MEI-2 dynamics during *C. elegans* development, we used spinning disk confocal microscopy and recorded anesthetized adult worms expressing sGFP::MEI-2 and mCherry::HIS-11 as a DNA marker. In the germline, sGFP::MEI-2 was detected in the proximal gonad, where it localized to mature oocytes, consistent with previous immunolocalization studies (Srayko et al., 2000). sGFP::MEI-2 was exclusively cytoplasmic and gradually accumulated to reach a maximum level in the “-1 oocytes” (Fig. 1 A, asterisk), which are close to the spermatheca (Fig. 1 Ai). The GFP signal is specific to Katanin, because it was strongly reduced upon inactivation of *mei-1* by RNAi (Fig. 1 Aii). Consistently, we noticed that MEI-2, when produced in *Escherichia coli*, is unstable in the absence of MEI-1. Thus, sGFP::MEI-2 is a good proxy to visualize Katanin dynamics in *C. elegans*. In early and late embryos, a bright GFP signal was detected on the polar bodies, but the signal in the cytoplasm was strongly reduced compared with the signal detected in oocytes (Fig. 1 Ai). Live imaging of dissected embryos revealed that sGFP::MEI-2 localizes to the meiotic spindle during meiosis I and meiosis II (Fig. S1 E), consistent with previous MEI-2 immunolocalization studies (Srayko et al., 2000). Unexpectedly, sGFP::MEI-2 was also found in mitotic embryos, not only at the one-cell stage but also in later stages. In one-cell embryos, sGFP::MEI-2 first localized to the centrosomes before nuclear envelope breakdown and then invaded the pronuclear space and accumulated on the mitotic spindle and to the chromosomes. sGFP::MEI-2 was similarly dynamically recruited to the centrosomes and chromosomes during mitosis at the two-cell stage, as well as in later stages (Fig. 1 B). Although it was believed that Katanin is eliminated after meiosis and does not participate in mitosis in *C. elegans* embryos, our observations indicate that a fraction of Katanin is present during embryogenesis.

Phosphorylation of the N-terminal part of MEI-1 inhibits MT-stimulated Katanin ATPase activity

The finding that Katanin is readily detectable during embryogenesis prompted us to determine the exact molecular mechanisms regulating Katanin activity and stability in space and time. Several lines of evidence indicate that Katanin is regulated through phosphorylation: (a) MEI-1 exhibits a complex phosphorylation pattern by 2D gel electrophoresis (Gomes et al.,

A sGFP::MEI-2 ; mCherry::HIS-11



B sGFP::MEI-2 ; mCherry::HIS-11

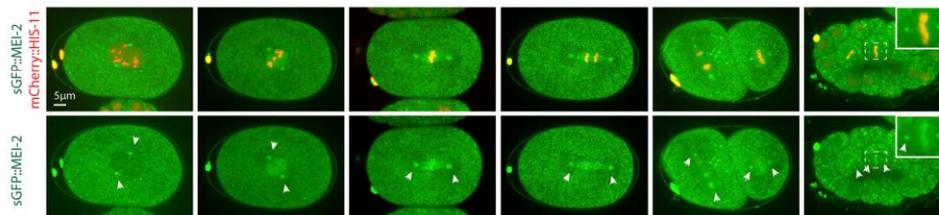


Figure 1. **sGFP::MEI-2 dynamics during *C. elegans* development.** (A) Spinning disk confocal micrographs of adult worm expressing sGFP::MEI-2 (in green) and mCherry::HIS-11 (in red) exposed to control (i) or *mei-1(RNAi)* (ii). Insets are higher magnifications of the boxed regions. Head of the worm is on the left of the picture. The full worm was reconstituted from ~10 different views and assembled using Photoshop. The germline is delimited by dashed lines. Sp, spermatheca; Ooc, oocytes; Emb, embryos; *, -1 oocyte. Scale bar represents 50 μ m. (B) Spinning disk confocal micrographs of early embryos expressing sGFP::MEI-2 (in green) and mCherry::HIS-11 (in red) at the one-cell (P0) and two-cell (AB and P1) stages. The anterior of the embryo is oriented toward the left in this and other figures. Scale bar represents 5 μ m.

2013), (b) inactivation of the PP4^{PPFR-1} complex alters this phosphorylation pattern, (c) PP4^{PPFR-1} acts genetically as a Katanin activator (Gomes et al., 2013; Han et al., 2009), and (d) MBK-2 directly phosphorylates MEI-1 at the meiosis-to-mitosis transition, possibly targeting Katanin for degradation (Pang

et al., 2004; Pellettieri et al., 2003; Quintin et al., 2003; Stitzel et al., 2006). As MBK-2 localizes at the centrosomes and chromosomes in mitotic embryos during embryogenesis (Pellettieri et al., 2003), similarly to Katanin, we revisited the exact role of MBK-2 in the regulation of Katanin activity and stability.

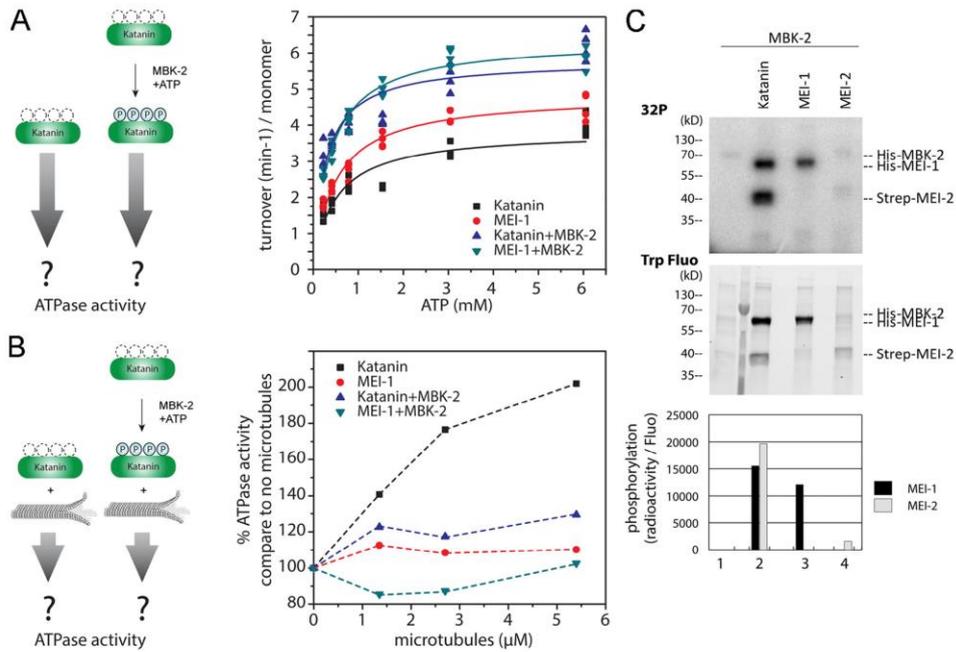


Figure 2. MEI-1 phosphorylation by MBK-2 inhibits MT-stimulated Katanin ATPase activity. (A) ATPase activity of Katanin or MEI-1 alone before and after phosphorylation by MBK-2 as a function of different ATP concentrations. Turnover from four independent experiments are represented and fitted using Origin. (B) ATPase activity of Katanin or MEI-1 alone before and after its phosphorylation by MBK-2 as a function of MT concentration. (C) Radioactive in vitro kinase assay using MBK-2 kinase and Katanin, MEI-1 or MEI-2 alone as substrates. Autoradiograph of SDS-PAGE showing γ - ^{32}P incorporation into MEI-1 and MEI-2 (upper panel). The graph corresponds to the quantification of the radioactivity incorporated into the MEI-1 or MEI-2 divided by the total amount of MEI-1 or MEI-2 quantified using tryptophan fluorescence (Stain Free; Bio-Rad). This experiment is representative of one experiment that was reproduced three times.

It has been shown that Katanin ATPase activity is stimulated by the presence of MTs (McNally and Vale, 1993; Hartman et al., 1998; Joly et al., 2016; Zehr et al., 2020). We thus investigated whether Katanin phosphorylation by MBK-2 could regulate Katanin ATPase activity stimulated by MTs. To this end, we prephosphorylated Katanin by MBK-2 and measured its ATPase activity in vitro, in the absence (Fig. 2 A) or presence (Fig. 2 B) of MTs. We first controlled that phosphorylation of Katanin by MBK-2 is not drastically changing the ATPase activity of the enzyme (V_{max} or K_m , Fig. 2 A). We then tested the effect of MTs on Katanin ATPase activity. While MTs stimulated the ATPase activity of Katanin by approximately two- to threefold, they failed to stimulate the ATPase activity of Katanin that had been prephosphorylated by MBK-2, which exhibits only a basal ATPase activity in these conditions (Fig. 2 B). These results indicate that Katanin phosphorylation by MBK-2 inhibits its MT-stimulated ATPase activity.

We next set out to identify the Katanin residues phosphorylated by MBK-2 responsible for this activity. To this end, we performed in vitro kinase assays using highly purified components (MBK-2 and Katanin) produced in *E. coli* (Fig. 2 C) and

subjected the reaction product to liquid chromatography/tandem mass spectrometry (LC-MS/MS) analysis (Fig. 3 A). This analysis showed that MBK-2 phosphorylates MEI-1 at S92, consistent with a previous report (Stitzel et al., 2006), but also at S90, S113, and S137 (Fig. 3 A), consistent with the appearance of multiple phosphorylated MEI-1 isoforms in 2D gel analysis of embryonic extracts (Gomes et al., 2013). All these residues are located in the N-terminal regulatory domain of MEI-1. MBK-2 also phosphorylates MEI-2 at T32, S68, and S86 but only if MEI-1 is present, indicating that MEI-1 is essential for MBK-2-dependent MEI-2 phosphorylation (Fig. 2 C). Consistent with MBK-2 phosphorylating MEI-1 and MEI-2 at multiple sites, MBK-2 induced important mobility shifts to MEI-1 and MEI-2, with the appearance of multiple slow migrating bands on PhosTag SDS-PAGE that typically resolves the different phosphorylated isoforms (Fig. S2 A).

To evaluate the relative contribution of each site of MEI-1 phosphorylation by MBK-2, we produced and purified Katanin with each "phospho-site" substituted by a nonphosphorylatable residue (alanine or glycine) and repeated the in vitro kinase assay with MBK-2 in the presence of radiolabeled $[\gamma\text{-}^{32}\text{P}]\text{-ATP}$

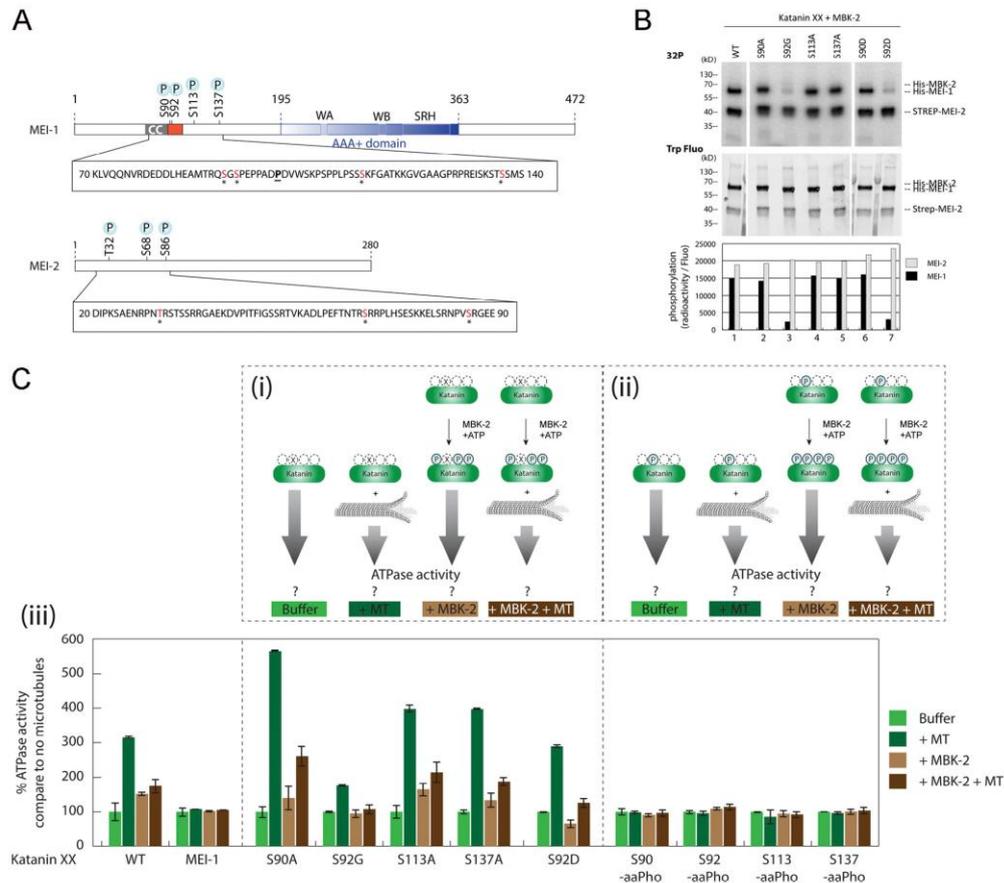


Figure 3. Phosphorylation of the N-terminal disordered region of MEI-1 inhibits the stimulatory effect of MTs on Katanin ATPase activity. (A) Schematic representation of MEI-1 and MEI-2. The positions of phosphorylated sites identified by LC-MS/MS after *in vitro* phosphorylation of Katanin by MBK-2 are indicated by asterisks (*). Red box represents the PEST sequence, a predicted interacting site for MEL-26 (Fig. S5). AAA+ domain in blue contains Walker A (WA) and Walker B (WB) motifs as well as second region of homology (SRH). CC, coiled-coil. The position of the gain-of-function mutation P99L is indicated (underlined). (B) Radioactive *in vitro* kinase assays using MBK-2 kinase and Katanin, WT or containing serine to alanine substitutions in MEI-1 N-terminal at specific positions, as substrates. Autoradiograph of SDS-PAGE showing γ - ^{32}P incorporation in MEI-1 and MEI-2 (upper panel). Total Katanin present in each lane of the same SDS-PAGE using Stain Free (Bio-Rad), based on tryptophan labeling (middle panel). Graphs showing quantification of the ratio of radioactive MEI-1 and MEI-2 versus the total amount of protein (bottom panel). Gels were quantified using ImageJ, and results are represented in the histogram. The results shown are representative of one experiment that was reproduced three times. (C) Unmodified and phosphorylated Katanin ATPase activity in the absence or presence of MTs. The top panels (Ci and Cii) show the schematics of the experiment and the different Katanin versions used in the assay. Ciii, the bottom panel, shows Katanin ATPase activity presented as percentage of Katanin ATPase activity measured without MTs and without MBK-2. For each Katanin, the measured ATP activity in the absence of MT and MBK-2 was normalized to 100% (first condition, light green bars). (Ci) Katanin (green oval), WT or containing site-specific serine to alanine substitution in MEI-1, was phosphorylated or not by MBK-2, and then the ATPase activity of the enzyme was measured in the absence or presence of MTs. (Cii) Katanin containing MEI-1 phosphorylated at specific sites by genetic code expansion in *E. coli* was phosphorylated or not by MBK-2, and then the ATPase activity of the enzyme was measured in the absence or presence of MTs. Experiments in each condition were performed at least four times.

(Fig. 3 B). We substituted S92 by a glycine because we were unable to produce a full-length version of MEI-1 with the S92 substituted by an alanine in *E. coli*. Substitution of S92 by glycine (S92G) decreased $[\gamma^{32}\text{P}]$ -ATP incorporation by 80%, whereas the

individual substitution of the other residues (S90A or S113A or S137A) had only a modest effect. We conclude that S92 is the main residue phosphorylated by MBK-2, consistent with the previous report (Stitzel et al., 2006).

To test the contribution of each MEI-1 phospho-site to the inhibition of MT-dependent stimulation of the ATPase activity of Katanin, we produced and purified Katanin with MEI-1 singly phosphorylated at each position (S90, S92, S113, and S137) using phospho-serine incorporation in *E. coli* by genetic code expansion (Rogerson et al., 2015). Soluble Katanin complexes with MEI-1 phosphorylated at each position were produced in *E. coli*, indicating that phospho-serine incorporation does not drastically alter Katanin solubility or stability. Then, we measured the ATPase activity of Katanin, nonmodified or phosphorylated at each position in the presence or absence of MTs (Fig. 3 Ciii). Strikingly, while MTs greatly stimulated the ATPase activity of nonmodified Katanin (WT or variants), they failed to stimulate the ATPase activity of Katanin singly phosphorylated at any of the four serine residues, indicating that MEI-1 phosphorylation in the N-terminal regulatory domain renders Katanin insensitive to the presence of MTs (Fig. 3 Ciii). Introduction of phosphomimetic residue (aspartate), however, failed to phenocopy the effect of MEI-1 phosphorylation on the ATPase activity of Katanin (Fig. 3 C, S92D vs. S92-aaPho). Indeed, introduction of a negatively charged aspartate at position S92 did not inhibit MT-dependent ATPase activity of Katanin, whereas the phosphorylation of this variant by MBK-2 totally abrogated MT-dependent ATPase activity stimulation. Taken together, these results indicate that MEI-1 phosphorylation in its N-terminal regulatory domain renders Katanin insensitive to the presence of MTs. We conclude that MBK-2, by phosphorylating the catalytic MEI-1 Katanin subunit, inhibits Katanin ATPase activity stimulated by MTs.

Site-specific MEI-1 phosphorylation enhances its affinity for MEL-26

The finding that Katanin ATPase activity is inhibited by MEI-1 phosphorylation might explain why Katanin is tolerated during mitosis. However, a significant Katanin fraction is targeted for degradation after meiosis. Given that the MBK-2-dependent S92 phosphorylation of MEI-1 has been implicated in Katanin degradation (Stitzel et al., 2006), we investigated whether phosphorylation of that site is necessary and sufficient to target Katanin for CRL3^{MEL-26}-mediated degradation, or whether the other MEI-1 phosphorylation sites also contribute to this process.

Although the interaction between MEL-26 and MEI-1 has been detected by different approaches, including yeast two-hybrid (Gomes et al., 2013; Pintard et al., 2003b), no assays have been used to detect and quantify the direct interaction between the purified proteins. We thus developed a sensitive assay (Far-Western ligand binding assay) to monitor and quantify the interaction between MEL-26 and MEI-1 (Fig. 4). Briefly, Katanin was separated on SDS-PAGE and transferred to polyvinylidene fluoride (PVDF) membrane (denaturing conditions) or directly spotted on nitrocellulose membrane (native conditions). The membrane was then incubated with MEL-26, and MEL-26-Katanin interaction was detected with anti-MEL-26 antibodies (Fig. 4).

In this assay, MEL-26 weakly interacted with unmodified MEI-1. However, a robust binding was observed between MEL-26

and MEI-1 phosphorylated by MBK-2 (Fig. 4, C and D [lanes 1–2 and 11–12]). Consistent with previous genetic data, indicating that the product of the gain of function allele MEI-1 P99L is refractory to degradation (Clark-Maguire and Mains, 1994; Pintard et al., 2003b), this variant failed to robustly interact with MEL-26 even after phosphorylation by MBK-2 (Fig. 4, C and D [lanes 9–10]). Likewise, only weak binding was observed between the nonphosphorylatable MEI-1 S92G and MEL-26 (Fig. 4, C and D [lanes 3–4]). Individually substituting the other serines with alanines (nonphosphorylatable) did not alter MEL-26 binding to MEI-1 even after MEI-1 phosphorylation. Importantly, strong binding between MEI-1 and MEL-26 was observed using MEI-1 uniquely phosphorylated at S92 by phosphoserine incorporation in *E. coli* (MEI-1 S92-aaPho, Fig. 4, C and D [lanes 13–14]). The MEI-1 S92D phospho-mimetic also constitutively interacted with MEL-26, although at a reduced level, indicating that aspartate only partially mimics MEI-1 phosphorylation (Fig. 4, C and D [lanes 5–6]). Prior phosphorylation of MEI-1 S92D by MBK-2 did not enhance MEL-26 affinity for MEI-1 (compare Fig. 4 C and D, lanes 5 and 6), further indicating that MEI-1 phosphorylation at the other serines does not contribute to MEI-1 binding to MEL-26. Taken together, these observations unequivocally show that MEI-1 phosphorylation by MBK-2 at S92, but not at the other serines (S90, S113, or S131), increases MEI-1 affinity for MEL-26 in vitro.

MEI-1 phosphorylation at residue S92 is necessary and sufficient to target Katanin for degradation

To decipher whether MEI-1 phosphorylation at S92 is necessary and sufficient for MEI-1 degradation in vivo, we generated lines expressing FLAG::mei-1 RNAi-resistant transgenes (Fig. 5 A; hereafter FLAG::mei-1^R) producing FLAG::MEI-1 WT, the non-phosphorylatable FLAG::MEI-1 S92A, or the phosphomimetic FLAG::MEI-1 S92D proteins using Mos1-mediated Single Copy Insertion (MosSCI; Frøkjær-Jensen et al., 2008). We then tested the ability of the transgenes to support viability upon endogenous MEI-1 depletion by RNAi.

All transgenes were readily expressed in embryos; FLAG::MEI-1 S92A and S92D were produced at the expected size and at levels similar to FLAG::MEI-1 WT and endogenous MEI-1 (Fig. 5 B). Embryos from animals expressing these transgenes were viable (>80% embryonic viability for FLAG::mei-1^R S92A), indicating that these variants do not act as strong dominant negatives (Fig. 5, C and D). We next used RNAi to deplete endogenous mei-1 to evaluate the functional consequences of expressing FLAG::MEI-1 WT, S92A, or S92D as the sole source of MEI-1 (Fig. S3 and 6 A).

Consistent with previous reports, RNAi-mediated mei-1 inactivation in WT “control” N2 animals resulted in severe embryonic lethality (Fig. 5 C); mei-1(RNAi) embryos presented the large polar bodies phenotype resulting from defects in female meiotic spindle assembly (Fig. 5 and S4). Animals expressing FLAG::mei-1^R S92A depleted of endogenous mei-1 also produced dead embryos. However, this transgene fully rescued the defects in meiotic spindle assembly (Fig. S4), indicating that the observed embryonic lethality is likely due to defective mitosis. We then used differential interference contrast (DIC) microscopy to film the division of one-cell embryos. Embryos expressing FLAG::

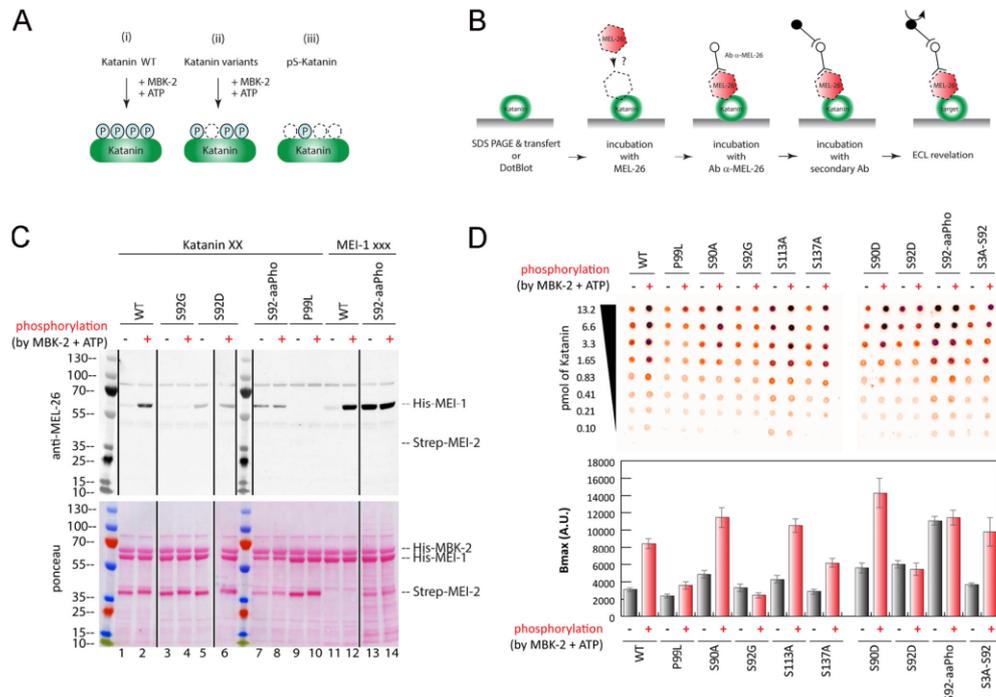


Figure 4. Site-specific MEI-1 phosphorylation at S92 increases MEI-1 affinity for MEL-26. (A) Schematic of the different phosphorylated forms (P, phosphate) of Katanin (green oval) used in the assay. (Ai) WT Katanin phosphorylated by MBK-2. (Aii) Katanin with site-specific substitutions replacing serine by nonphosphorylatable alanine. (Aiii) Site-specific Katanin phosphorylation by genetic code expansion in *E. coli*. (B) Schematics of the different steps of the Far-Western blot method used to detect the interaction between MEI-1 and MEL-26. Purified Katanin (green oval) was separated on SDS-PAGE and transferred to PVDF membrane (denatured as in C) or directly spotted on nitrocellulose membrane (native as in D). The membrane was then incubated with purified MEL-26 (red hexagon). After extensive washing of the membrane, the interaction between MEL-26 and MEI-1 was detected using MEL-26 antibodies and classic ECL revelation. (C) MEL-26-Katanin interaction detected by Far-Western ligand binding assay after separation of Katanin or MEI-1 using SDS-PAGE (denaturing conditions). Top panel corresponds to MEL-26 detection via specific antibody against MEL-26 and ECL revelation. Bottom panel shows the same membrane stained with Ponceau Red to show protein loading. Experiment was performed at least three times, and the membranes presented are representative of the results. (D) MEL-26-Katanin interaction detected by Far-Western ligand binding assay after spotting decreasing amounts (top > down) of Katanin on nitrocellulose membrane (native conditions). Histogram summary of the maximal binding (Bmax) values extracted from the fitted binding curve are presented in Fig. S2.

mei-1^R S92A displayed severe defects in MT-mediated processes (Fig. 5 F). Mitotic spindles were misoriented, ectopic cleavage furrows formed after cytokinesis, and nuclei became displaced toward the cell cortex after mitosis. We confirmed these observations using spinning disk confocal microscopy by recording tubulin and histone fused to GFP and mCherry, respectively. In embryos expressing FLAG::*mei-1^R* S92A, the mitotic spindle was shorter, failed to elongate, and often broke during anaphase (Fig. 5, E and F). The mitotic spindle generally broke between the sister chromatids at the central spindle, resulting in the mispositioning of the midbody, but in other cases, the spindle broke at the kinetochore MTs, resulting in the segregation of all the chromosomes to one daughter cell (Fig. 5 G). All these phenotypes are typical of embryos expressing a persistent form of MEI-1 (Clark-Maguire and Mains, 1994; Kurz et al., 2002;

Pintard et al., 2003b). Remarkably, embryos expressing FLAG::*mei-1^R* S92D, which constitutively interacts with MEL-26, did not show these phenotypes and were mainly viable in the absence of endogenous MEI-1 (Fig. 5 C). Taken together, these observations strongly suggest that phosphorylation of MEI-1 at a single serine (S92) is both necessary and sufficient to target Katanin for degradation after meiosis. Consistently, Western blot experiments revealed that FLAG::MEI-1 S92A, accumulated in embryos depleted of endogenous *mei-1*. Quantitative analysis of multiple Western blot experiments revealed that FLAG::MEI-1 S92A accumulated threefold compared with FLAG::MEI-1 WT. Consistent with our observations that FLAG::MEI-1 S92D constitutively interacts with MEL-26, FLAG::MEI-1 S92D did not accumulate in embryos, suggesting that introduction of the phosphomimetic residue at position 92 is sufficient to target Katanin for degradation by the CRL3^{MEL-26} E3 ligase.

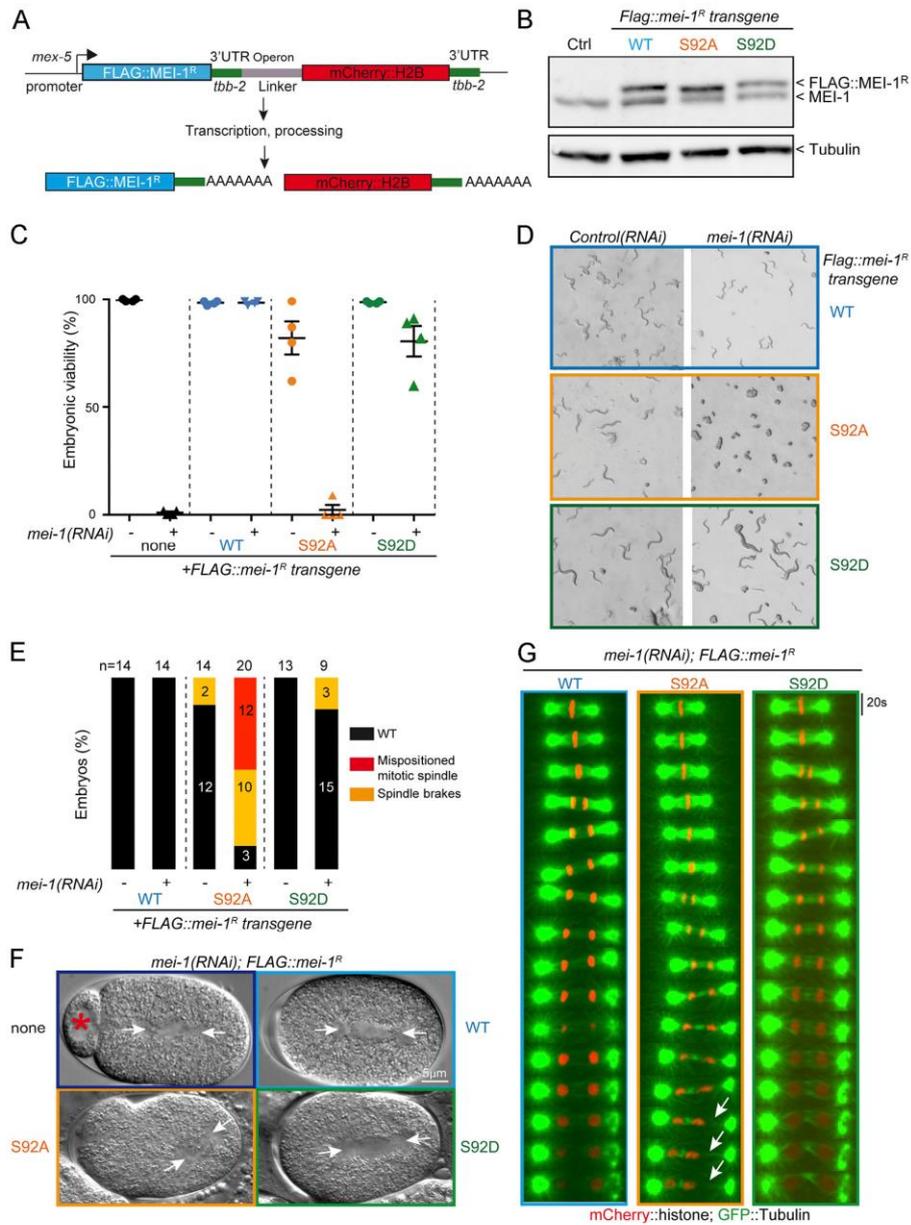


Figure 5. **The nonphosphorylatable MEI-1 S92A version is toxic in vivo in the absence of endogenous MEI-1.** (A) Schematic showing the strategy used for expressing RNAi-resistant *mei-1^R* S92A and *mei-1^R* S92D transgenes (*mei-1^R*) in the *C. elegans* germline. The operon linker is the intergenic region from the *gpd-2/gpd-3* operon. (B) Western blot analysis of embryonic extracts of the indicated genotype using MEI-1 (upper panel) and tubulin (lower panel) antibodies. (C) Viability of embryos expressing FLAG::*mei-1^R* transgenes WT and mutants upon RNAi-mediated inactivation of endogenous *mei-1*. Error bars represent SEM;

n = 4 independent experiments performed in triplicate with >100 embryos each. (D) DIC images of animal progeny with the indicated genotype exposed to control or *mei-1(RNAi)* for 36 h at 23°C. (E) Percentage of mitotic embryos similar to WT (black bars), presenting a misaligned mitotic spindle (red bars) or a mitotic spindle that breaks during mitosis (orange bars). The number of embryos analyzed is indicated and was generated by aggregation of more than three independent experiments. (F) DIC images of one-cell-stage embryos of the indicated genotype upon inactivation of endogenous *mei-1*. Arrowheads indicate the mitotic spindle. (G) Live images of mitotic spindles of the indicated genotype carrying *GFP::α-Tubulin* (green) and *Histone2B::mCherry* (red) transgenes. Arrows indicate locations where the mitotic spindle breaks.

To further confirm these observations, we used specific MEI-1 antibodies and immunofluorescence to monitor MEI-1 levels during mitosis (Fig. 6 C). We also stained MTs to visualize the mitotic spindle. WT control embryos depleted of MEI-1 presented the large polar body phenotype but assembled a normal mitotic spindle (Fig. 6 C, Ctrl). MEI-1 was undetectable in these embryos, indicating that our RNAi conditions efficiently depleted endogenous MEI-1. In embryos expressing FLAG::MEI-1 WT, the mitotic spindle was properly aligned along the anteroposterior axis of the

embryos, and long astral MTs contacting the cortex were observed (Fig. 6 C, WT). MEI-1 was present on the centrosomes and chromosomes, but it was barely detectable. This staining is highly specific, confirming our live-imaging analysis using sGFP::MEI-2 and indicating that Katanin is present at low levels in mitotic embryos (Figs. S1 and 1). In embryos expressing only FLAG::MEI-1 S92A, MEI-1 readily accumulated at high levels to the centrosomes and chromosomes (Fig. 6 C, S92A and S92D). The mitotic spindle was often misoriented in these embryos (Fig. 5 F [white arrows])

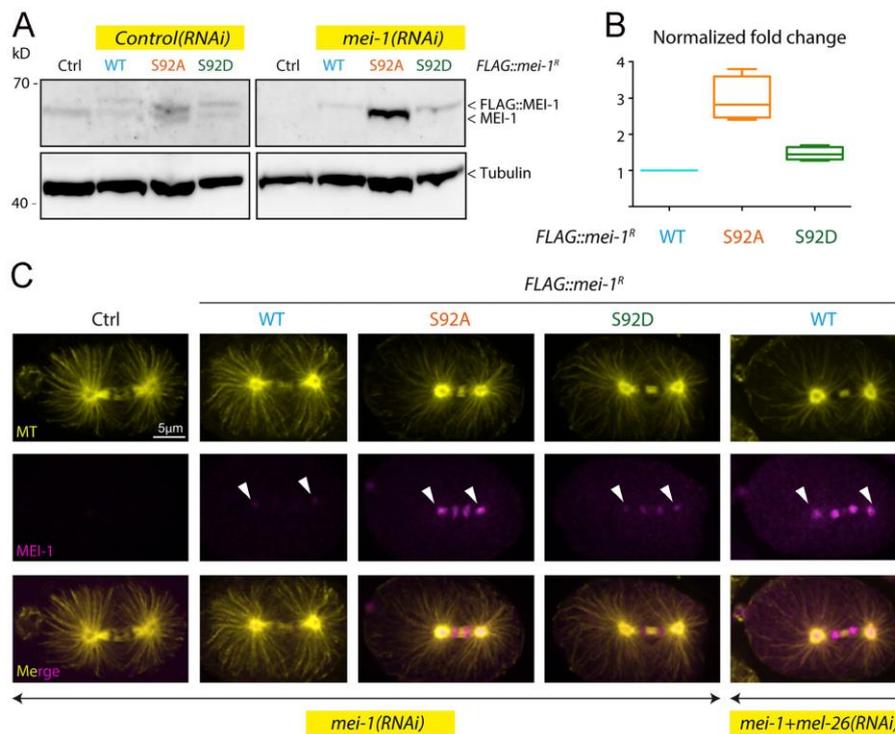


Figure 6. Site-specific MEI-1 phosphorylation (S92) is necessary and sufficient to target MEI-1 for degradation. (A) Western blot analysis of embryonic extracts from N2 (WT control, ctrl), FLAG::MEI-1 WT (light blue), FLAG::MEI-1 S92A (orange), and FLAG::MEI-1 S92D (green), animals exposed to mock (*ctrl*) or *mei-1(RNAi)* using MEI-1 (upper panel) and tubulin (lower panel, loading control) antibodies. (B) Quantification of the ratio of MEI-1 versus tubulin signal intensity over three independent experiments revealed that MEI-1 levels accumulate by threefold in FLAG::MEI-1 S92A embryos compared with the FLAG::MEI-1 WT control or FLAG::MEI-1 S92D upon endogenous inactivation of *mei-1* by RNAi. Box-and-whiskers plot presenting MEI-1 levels quantified over three experiments. The whiskers represent the min and max values. (C) Representative spinning disk confocal micrographs of fixed early embryos of the indicated genotype immunostained with MEI-1 (magenta) and MT (yellow) antibodies. White arrowheads indicate the persistence of MEI-1 in mitosis at the centrosomes and the chromosomes. Additional representative images of embryos in metaphase are presented in Fig. S4.

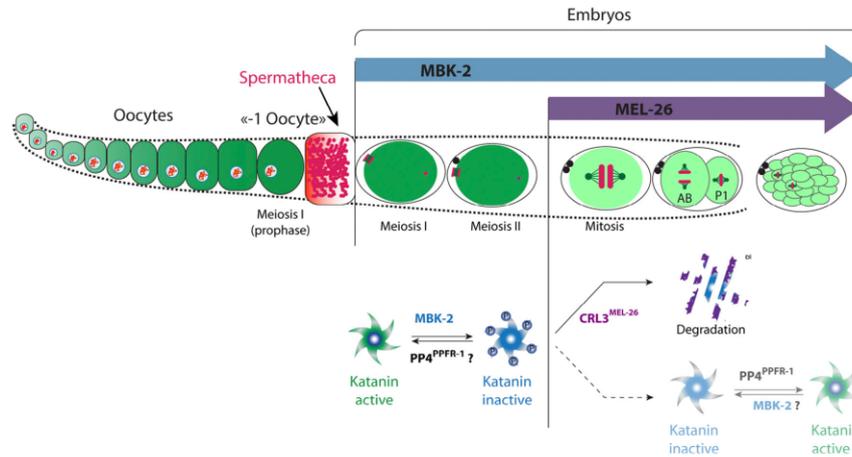


Figure 7. Working model of Katanin expression and regulation by cycles of phosphorylation and dephosphorylation during *C. elegans* development. Schematic representation of Katanin levels and regulation in *C. elegans* oocytes and embryos. In the top panel, the level of green color represents the amount of Katanin present in oocytes and embryos. Katanin accumulates during oogenesis to reach a maximal level in the oocyte located close to the spermatheca (-1 oocyte). Katanin levels remain elevated during meiosis I and II but drop after meiosis as a consequence of the activation of the MBK-2 kinase and expression of the MEL-26 E3-ligase subunit. The bottom panel presents a model of the molecular mechanisms regulating Katanin levels and activity. During meiosis, Katanin might cycle between dephosphorylated (Katanin active, green) and phosphorylated (inactive, light blue) states. After meiosis, a large Katanin fraction is targeted for ubiquitin-mediated degradation by the CRL3^{MEL-26} E3-ligase while a fraction escaping proteasomal degradation might cycle between phosphorylated and dephosphorylated states.

and Fig. S4 B). Consistent with Western blot experiments, FLAG::MEI-S92D did not accumulate in early embryos, although MEI-1 levels were slightly higher than in embryos expressing FLAG::MEI-1 WT (Fig. S4 and 6 C). Taken together, these results indicate that MEI-1 phosphorylation of the single residue S92 by MBK-2 is both necessary and sufficient to target MEI-1 for ubiquitin-mediated degradation by the CRL3^{MEL-26} E3 ligase. We conclude that MEI-1 phosphorylation regulates both Katanin activity and stability to deliver the appropriate level of MT-severing activity during *C. elegans* development (Fig. 7).

Discussion

The evolutionarily conserved MT-severing AAA-ATPase enzymes are important regulators of MT dynamics, with instrumental functions in cell division and cell migration (McNally and Roll-Mecak, 2018). However, how these enzymes are regulated in space and time during development to deliver the appropriate levels of MT-severing activity is poorly understood. Using an integrated combination of genetics, live-cell imaging, and biochemical approaches, we investigated the spatiotemporal expression of Katanin during *C. elegans* development and dissected the molecular mechanisms regulating its activity and stability. In particular, we show that phosphorylation of the N-terminal regulatory domain of the catalytic MEI-1 subunit regulates both Katanin stability and ATPase activity. It has been shown that MTs stimulate, by an unknown mechanism, the ATPase activity of Katanin, which is essential for MT severing

(McNally and Vale, 1993; Hartman and Vale, 1999; Joly et al., 2016; Zehr et al., 2020). Here we show that phosphorylation of the N-terminal regulatory domain of MEI-1 suppresses the stimulatory effect of MTs on Katanin ATPase activity, presumably inhibiting MT severing. In addition, we demonstrate unequivocally that site-specific phosphorylation of MEI-1 at S92 by MBK-2, but not at the other serines, is both necessary and sufficient to enhance the interaction between Katanin and the E3-ligase adaptor MEL-26, and to send Katanin to proteasome-dependent degradation. As the PP4^{PPFR-1} phosphatase likely dephosphorylates MEI-1 to stimulate Katanin activity (Gomes et al., 2013; Han et al., 2009), our results strongly suggest that cycles of phosphorylation and dephosphorylation regulate Katanin levels and activity in space and time during development, to deliver the appropriate amount of MT-severing activity.

Spatiotemporal expression and regulation of Katanin during *C. elegans* development

A wealth of genetic evidence indicates that Katanin is essential for meiotic spindle assembly, but it is toxic for the assembly of the mitotic spindle that forms in the same cytoplasm 20 min later. Previous work has established that Katanin is abundant in oocytes but is rapidly targeted for degradation after meiosis by the CRL3^{MEL-26} E3 ligase to allow mitotic spindle assembly. It was thus believed that *C. elegans* Katanin is entirely eliminated after meiosis and might not be produced during embryogenesis. Here, we used a strain expressing MEI-2 endogenously tagged with sGFP using CRISPR-based genome editing to monitor

Katanin dynamics during *C. elegans* development. Consistent with immunolocalization studies, we confirmed that Katanin accumulates in oocytes to reach a maximum level in the -1 oocytes, which are located close to the spermatheca (Fig. 1 A, asterisk). The sGFP::MEI-2 signal in oocytes was undetectable upon inactivation of *mei-1* by RNAi, indicating that sGFP::MEI-2 is a good proxy to visualize Katanin dynamics in worms. Unexpectedly, spinning disk confocal live-cell imaging revealed that sGFP::MEI-2 is also present during embryogenesis, although at a reduced level compared with oogenesis, where it is dynamically recruited to the mitotic spindle. Immunolocalization studies using highly specific MEI-1 antibodies also confirmed the presence of MEI-1 in mitotic embryos. Thus both subunits (MEI-1 and MEI-2) are present in embryos where Katanin may regulate aspects of chromosome segregation, similar to the situation in other systems (Jiang et al., 2017; Sharp and Ross, 2012; Zhang et al., 2007).

The machinery regulating Katanin activity and stability is also expressed during embryogenesis. Interestingly, seminal observations using the temperature-sensitive *mel-26(ct61)* allele and temperature shift experiments have shown that MEL-26 is continuously required from fertilization to gastrulation (26-cell stage; Mains et al., 1990). As MEI-1 is the only essential target of MEL-26 (Lu et al., 2004), this strongly suggests that MEI-1 levels are continuously regulated by the CRL3^{MEL-26} E3 ligase during embryogenesis. Also consistent with this hypothesis, MEL-26 is expressed throughout embryogenesis but decreases to low levels by the 64-cell stage (Johnson et al., 2009).

Similar to MEL-26 and Katanin, MBK-2 is expressed during embryogenesis, where it localizes to the centrosomes and chromosomes during mitosis (Pellettieri et al., 2003). Finally, the PP4^{PPFR-1} phosphatase, which activates Katanin by dephosphorylating MEI-1, is also present and active during mitosis. Indeed, down-regulation of PP4 phosphatase complex PP4^{PPFR-1} enhances the viability of embryos expressing a stabilized version of *mei-1* (Gomes et al., 2013). PP4 may directly interact with the N-terminal part of MEI-1 to accomplish this function, as suggested by the presence of a short motif [102-WSKPSPLPSSS-113] (bold and underlined represent the PP4-consensus binding motif WxxP) in the N-terminal part of MEI-1, presenting striking similarities with the recently identified consensus binding motif for PP4 protein phosphatases (Ueki et al., 2019). Collectively, these observations indicate that Katanin, along with the machinery regulating its levels (MBK-2 and MEL-26) and/or activity (MBK-2 and PP4), is present and active during embryogenesis. Our observations, along with the available literature, suggest the following model (Fig. 7). Katanin accumulates during oogenesis to reach a maximum level in the -1 oocytes, which are close to the spermatheca. In oocytes, MEL-26 is absent (Johnson et al., 2009), and MBK-2 is kept inactive at the cortex. During metaphase-to-anaphase transition of meiosis I, MBK-2 is activated and released into the cytoplasm (Cheng et al., 2009; Pellettieri et al., 2003; Stitzel et al., 2007). During meiosis, MEI-1 is likely subjected to cycles of phosphorylation and dephosphorylation that regulate its activity in space and time. In particular, Katanin is required to sever MTs between the second polar body and the future female pronucleus, an event

stimulated by the PP4^{PPFR-1} phosphatase (Gomes et al., 2013). Upon mitotic entry, MEL-26 is produced (Mains et al., 1990), and MEI-1 gets phosphorylated on residue S92 and sent for degradation by the 26S proteasome. However, a fraction of MEI-1 escapes ubiquitin-mediated degradation and is dynamically recruited to the centrosomes and chromosomes during mitosis, at least until gastrulation. In embryos, levels and activity of Katanin are thus regulated by cycles of phosphorylation and dephosphorylation and ubiquitin-mediated degradation.

An evolutionarily conserved mechanism to regulate Katanin activity by phosphorylation?

The sites modified by MBK-2, although not conserved, are all located in the N-terminal regulatory domain of MEI-1 (Fig. S5). Previous work has shown that differences in Katanin activity in the egg cytoplasm between *Xenopus laevis* and *Xenopus tropicalis* account for spindle scaling. Increased activity of Katanin scales the *X. tropicalis* spindle smaller compared with *X. laevis* (Loughlin et al., 2011). This difference in activity is regulated by the Aurora B kinase (Loughlin et al., 2011). A single phosphorylation of the N-terminal regulatory domain of *X. laevis* p60 subunit (S131) inhibits the MT-severing activity of the enzyme (Loughlin et al., 2011). This inhibitory phosphorylation site is not conserved in *X. tropicalis* Katanin, which exhibits higher Katanin-dependent MT-severing activity. How phosphorylation of *X. laevis* Katanin inhibits its activity, however, is poorly understood. It has been proposed that phosphorylation of serine 131 might affect the oligomeric state of the enzyme based on the observation that a phosphomimetic p60 S131E has reduced MT-stimulated ATPase activity at low concentrations but recovers WT activity at higher enzyme concentrations (Whitehead et al., 2013).

In *C. elegans* MEI-1, similar to the situation in *X. tropicalis* p60, this residue is a glycine (Fig. S5). However, introduction of phosphomimetic residue in place of the site modified by MBK-2 does not have the same effect as the S131E mutation. For instance, the ATPase activity of Katanin containing MEI-1 S92D is normally stimulated by MT in vitro, and this protein supports Katanin function during meiotic spindle assembly. Nevertheless, Katanin with MEI-1 uniquely phosphorylated at S92 is refractory to the presence of MTs. The observed difference between MEI-1 S92D and MEI-1 S92-aaPho might be due to the charge densities, distributions, and pKa of the carboxyl group of aspartic acid residue, which are quite different from a phosphate group. Whereas MEI-1 S92D mimics partially S92 phosphorylation in promoting MEI-1 binding to MEL-26, it fails to phenocopy the effect of MEI-1 phosphorylation in inhibiting MT-stimulated ATPase activity of Katanin. Similar effects were observed with Katanin variants containing S90, S113, or S137 residues singly phosphorylated at each position. These results suggest that *C. elegans* Katanin activity requires an optimal steric arrangement of these four residues, but introduction of a single phosphate on one of these sites is sufficient to perturb Katanin regulatory domain organization and enable MT-dependent stimulation of the ATPase activity. We speculate that a similar mechanism may operate in the case of *X. laevis* p60 and possibly also for Katanin in other species.

How do MTs stimulate Katanin ATPase activity?

While MEI-1 phosphorylation does not alter basal Katanin ATPase activity, phosphorylation of a single residue of the N-terminal regulatory domain is sufficient to strongly inhibit the ATPase activity stimulated by MTs. To decipher the exact role of this MEI-1 phosphorylation, it will be essential to understand how MTs stimulate Katanin ATPase activity. MTs could affect different properties of the oligomer. Similar to other AAA+ ATPases, Katanin is organized as a hexamer. The organization of the subunits within the hexamer allows the formation of the nucleotide binding and hydrolysis pocket at the interface between subunits. The binding of MTs might have an effect on (a) the formation of the oligomer or on (b) the nucleotide pocket organization, leading to more efficient ATP binding and/or hydrolysis. In both cases, upon MT binding, Katanin would undergo a structural rearrangement leading to enhanced ATPase activity. From a mechanistic point of view, controlling the activity of an enzyme directly by using substrate binding as signal is a very efficient mechanism limiting the unproductive use of ATP hydrolysis. In a similar way, maintaining a basal ATPase activity might be a selective advantage to ensure a very short delay of response when interacting with the substrate. Here we reveal an additional regulatory level: the phosphorylation of the N-terminal regulatory domain antagonizing the MT-binding signal and ensuring spatial and temporal regulation of the enzyme activity.

Materials and methods

Plasmids

The list of plasmids used in this study is provided in Table S1.

Nematode strains, culture conditions, and RNAi

C. elegans strains were cultured and maintained using standard procedures (Brenner, 1974; Stiernagle, 2006). Transgenic worms expressing FLAG:*mei-1^R* transgenes were generated by MosI-mediated single-copy gene insertion using the strain EG6699 (ttTi5605 II; unc-119(ed3) III; oxEx1578; Frøkjær-Jensen et al., 2008). Correct insertion of the transgene was verified by PCR. The list of *C. elegans* strains used in this study is provided in Table S2.

Embryonic lethality assays

Embryonic lethality was assayed after leaving L4 larvae on IPTG plates seeded with bacteria expressing mock or *mei-1* dsRNA at 22°C–25°C. After 24–36 h, five adult worms were transferred onto a new plate. After 5 h, the worms were removed from the plate, and the progeny were counted after 24 h. Embryonic lethality was then scored as the percentage of dead embryos found among the progeny.

Protein purification

Katanin (6xHis-MEI-1 WT or variant Strep-MEI-2) were purified from BL21 (DE3) bacteria transformed with pNJ plasmids (see Table S1) as described in Joly et al. (2016). Before storage, buffer was exchanged to 50 mM Tris HCl, pH 8.0, 500 mM NaCl, and 5% glycerol using G25 columns, and the proteins were snap frozen in liquid nitrogen and stored at –80°C.

6xHis-MEI-1 and Strep-MEI-2 were purified from BL21 (DE3) bacteria transformed with pNJ420 and pNJ440, respectively, following the same protocol as previously described in Joly et al. (2016) and stored in 50 mM Tris HCl, pH 8.0, 500 mM NaCl, and 5% glycerol.

Production and purification of Katanin phosphorylated at specific sites by genetic code expansion in *E. coli*

Phospho-inserted Katanin was purified from BL21 (DE3) ΔSerB strain transformed with pNJ797 and derivative, allowing the production of MEI-1 WT-6xHis and Strep-MEI-2 or MEI-1 Xaa-Pho-6xHis and Strep-MEI-2 derivative, respectively (see Table S1). Briefly, 1 liter of Luria-Bertani medium supplemented with 1 mM phosphoserine was inoculated with overnight culture (1% vol/vol) and grown at 37°C to OD_{600nm} 0.4–0.6. The protein production was induced with 0.5 mM final concentration of IPTG for 5 h at 24°C. After centrifugation, cells were resuspended in 50 mM Tris HCl, pH 8.0, 500 mM NaCl, and 5% glycerol and broken by sonication. The supernatant was loaded onto a StrepTrap HP (GE Healthcare), and after washing, the protein was eluted using 10 mM desthiobiotin. The protein eluate was directly loaded on a HiTrap Chelating HP column (GE Healthcare) precharged with nickel, and the bound proteins were eluted using imidazole in the lysis buffer after extensive washes. The buffer was exchanged to 50 mM Tris HCl, pH 8.0, 500 mM NaCl, and 5% glycerol using G25 columns, and the proteins were snap frozen in liquid nitrogen and stored at –80°C. All the phospho-inserted purifications were verified by mass spectrometry and showed 100% of phosphoserine amino acid at the chosen position.

6xHis-MBK-2 was purified from BL21 (DE3) transformed with pNJ644, allowing the production of 6xHis-MBK-2. Briefly, 1 liter of Luria-Bertani medium was inoculated with an overnight culture (1% vol/vol) and grown at 37°C to OD_{600nm} 0.4–0.6. Protein production was induced with 0.1 mM final concentration of IPTG for 16 h at 18°C. After centrifugation, cells were resuspended in 50 mM Tris HCl, pH 8.0, 500 mM NaCl, and 5% glycerol and broken by sonication. The supernatant was loaded on a HiTrap Chelating HP column (GE Healthcare) precharged with nickel, and the bound proteins were eluted using imidazole in the lysis buffer after extensive washes. The buffer was exchanged to 50 mM Tris HCl, pH 8.0, 500 mM NaCl, and 5% glycerol using G25 columns, and the proteins were snap frozen in liquid nitrogen and stored at –80°C.

Tubulin was purified from pig brain using three rounds of polymerization/depolymerization cycles and resuspended into BRB80 buffer (80 mM Pipes-KOH, pH 6.8, 1 mM MgCl₂, and 1 mM EGTA). Rhodamine-labeled tubulin from porcine brain was purchased from Cytoskeleton. Protein concentrations were estimated using the method of Lowry et al. (1951), and protein purity was estimated on SDS-PAGE stained with Coomassie blue.

Far-ligand binding assay (Far-Western blot)

Far-Western ligand binding assays were performed essentially as described (Wu et al., 2007) on NuPAGE 4–12% (Invitrogen) run in MOPS buffer and transferred to a 0.45-mm PVDF membrane. For the dot blot assay, sample (2 μl) was directly spotted

Joly et al.

Regulation of Katanin by phosphorylation

Journal of Cell Biology

12 of 15

<https://doi.org/10.1083/jcb.201912037>

onto nitrocellulose membrane and air dried. The membranes were then incubated for 6 h at 4°C in blocking solution (TBS-Tween 0.05% with 5% milk and 1% BSA). Membranes were then incubated in the blocking solution containing 2 mg of GST-MEL-26 for 14 h at 4°C. After washing, membranes were incubated with anti-MEL-26 antibody (1:2,000) for 4 h, and anti-rabbit-HRP antibody was used. Western blot was revealed using enhanced chemiluminescence (ECL) Immobilon Western (Millipore) and scanned with ImageQuant LAS4000 (GE). Blots were analyzed and quantified using ImageJ (National Institutes of Health).

ATPase activity

Steady-state ATPase assays were used to monitor Katanin ATPase activity and performed as described in Joly et al. (2016). Briefly, assays were performed at 28°C in the presence of an NADH-coupled regeneration system (Nørby, 1988) in 100 µl final volume, in buffer containing 25 mM Tris-HCl, pH 8.0, 10 mM MgCl₂, 1 mM DTT, 1 mM NADH, 10 mM phosphoenolpyruvate, 10 U/ml pyruvate kinase, 20 U/ml lactate dehydrogenase, ATP (0–20 mM), and Katanin or MEI-1 (0–10 µM). For the MT-stimulated ATPase assay, a fixed concentration of Katanin or MEI-1 (0.4 µM) was used and mixed with different concentrations of MTs (as indicated). OD₂₄₀ was read using a SpectraMax2 plate reader. Experiments were performed at least five times.

In vitro kinase assay

In vitro kinase assay was performed at 30°C for 30 min in 10 µl containing 50 mM Tris-HCl, pH 8.0, 10 mM MgCl₂, 500 mM NaCl, 5% glycerol, 0–2 µM His-MBK-2, and 0–2 µM Katanin or MEI-1 or MEI-2. After 5-min incubation at 30°C, reactions were initiated by adding either 0.2 mM ATP or a mix of 0.2 mM ATP and 5 µCi γ-[³²P]ATP (for radioactive experiments) for 30 min at 30°C. Reactions were stopped by adding 5 µl of Laemmli buffer and immediately boiled for 5 min. All the samples were loaded on 12% SDS-PAGE (TGX Bio-Rad) and run in 1× Tris/glycine/SDS buffer. Proteins were detected using Stain Free technology and ChemiDoc MP Imaging System (Bio-Rad), and radioactivity was measured by Amersham Typhoon Imager (GE) and analyzed using ImageJ. Mass spectrometry analysis was performed using the same method as described in Tavernier et al. (2015).

Western blotting and antibodies

Western blot analysis was performed using standard procedures (Sambrook et al., 1989). Antibodies include rabbit anti-MEI-1 (Pintard et al., 2003b), mouse anti-tubulin (DM1A, Sigma-Aldrich), and goat anti-GFP (polyclonal; Rockland, 039600-101-215). HRP-conjugated anti-mouse, anti-rabbit, and anti-goat antibodies (Sigma-Aldrich) were used at 1:3,000, and the signal was detected with chemiluminescence (Millipore).

The anti-MEI-1 antibody purified on strip was further purified on acetone powder prepared from adult worms depleted of MEI-1 by RNA interference.

Live imaging and image analysis

Live imaging of full worms

Imaging of full worms was performed using a spinning disk confocal microscope. Adult worms were anesthetized using

levamisole and transferred onto an agarose pad on a 24 × 60-mm coverslip mounted on a metal holder. A coverslip (18 × 18 mm) was placed on top. Live imaging was performed at 23°C using a spinning disc confocal head (CSU-W1; Yokogawa Corporation of America) mounted on a DMI8 inverted microscope (Leica) equipped with 491- and 561-nm lasers (491-nm 150 mW; DPSS Laser 561 nm 150 mW) and a complementary metal-oxide-semiconductor (Orca-Flash 4 V2+, Hamamatsu). Acquisition parameters were controlled by MetaMorph software (Molecular Devices). In all cases, a 40×, HC PL APO 40×/1.30 Oil CS2 (Leica 506358) lens was used, and ~10 z-sections were collected at 0.5-µm intervals. Each “reconstituted worm” was assembled in Adobe Photoshop from 8–10 fields of view. Captured images were processed using ImageJ and Photoshop.

Live imaging of embryos

Imaging of dissected embryos was performed using a spinning disk confocal microscope. Adult worms were dissected in 4 µl of L-15 blastomere culture medium on a 24 × 60-mm coverslip mounted on a metal holder. The drop of medium was surrounded by a ring of petroleum jelly that served as a spacer, preventing compression of the embryos. A coverslip (18 × 18 mm) was placed on top to seal the chamber and prevent evaporation during filming. Live imaging was performed at 23°C using a spinning disc confocal head (CSU-X1; Yokogawa Corporation of America) mounted on an Axio Observer.Z1 inverted microscope (Zeiss) equipped with 491- and 561-nm lasers (OX-XIUS 488 nm 150 mW, OXXIUS Laser 561 nm 150 mW) and an electron-multiplying charge coupled device (QuantEM 512SC, Photometrics). Acquisition parameters were controlled by MetaMorph software (Molecular Devices). In all cases a 63×, Plan-Apochromat 63×/1.4 Oil (Zeiss) lens was used, and approximately four z-sections were collected at 1-µm and 10-s intervals. Captured images were processed using ImageJ and Photoshop.

Live imaging was performed at 23°C using a spinning disc confocal head (CSU-X1; Yokogawa Corp. of America) mounted on a Ti-E inverted microscope (Nikon) equipped with 491- and 561-nm lasers (Roper Scientific) and a charge-coupled device camera (Coolsnap HQ2; Photometrics). Acquisition parameters were controlled by MetaMorph software (Molecular Devices). In all cases a 60×, 1.4 NA PlanApochromat lens with 2 × 2 binning was used, and four z-sections were collected at 2-µm intervals every 20 s.

Live imaging of mitotic divisions by DIC

For the visualization of early embryonic development in live specimens by DIC (Fig. 5), embryos were obtained by cutting open gravid hermaphrodites using two 21-gauge needles. Embryos were handled individually and mounted on a coverslip in 7 µl of egg buffer (Shelton and Bowerman, 1996). The coverslip was placed on a 2% agarose pad. Time-lapse DIC images were acquired by an Axiocam Hamamatsu ICc camera (Hamamatsu Photonics) mounted on a Zeiss AxioImager A1 microscope equipped with a Plan Neofluar 100×/1.3-NA objective (Zeiss), and the acquisition system was controlled by Axiovision software (Zeiss). Images were acquired at 10-s intervals.

Joly et al.

Regulation of Katanin by phosphorylation

Journal of Cell Biology

13 of 15

<https://doi.org/10.1083/jcb.201912037>

Immunofluorescence and imaging

10–15 worms were dissected in 7 μ l of blastomere culture solution on subbing solution-coated slides using a 21-gauge needle to release embryos. An 18 \times 18-mm coverslip was placed onto the drop, and the slide was frozen on a block of metal precooled on packed dry ice. After 20 min, the coverslip was flicked off, and the slide was plunged into -20°C methanol for 20 min. Slides were rehydrated in PBS for 5 min and incubated overnight at 4°C with 30 μ l of primary antibodies in 3% BSA in PBS in a wet chamber. Affinity-purified rabbit anti-MEI-1 antibody was used at a dilution of 1:500, mouse monoclonal anti- α -tubulin antibody (DM1A; Sigma-Aldrich) was used at 1:400, and the secondary antibodies were coupled to the fluorophores Alexa Fluor 488 or 543 (Molecular Probes) used at 1:1,000. Embryos were mounted in Vectashield mounting medium with DAPI. Fixed embryos were imaged using a spinning disk confocal X1 microscope with 63 \times objective. Captured images were processed using ImageJ and Photoshop.

Graphs and statistical analysis

Prism 6 (GraphPad Software) was used to generate graphs and proceed to statistical analysis. The tests used are mentioned in the figure legends.

Online supplemental material

Fig. S1 shows the construction and characterization of a *C. elegans* line expressing MEI-2 endogenously tagged with sGFP. **Fig. S2** shows the qualitative analysis of phosphorylated Katanin on PhosTag SDS-PAGE, after Coomassie staining (A); the quantitative analysis of the interaction between MEL-26 and Katanin (B); and that phosphorylation of the N-terminal Katanin region inhibits MT-dependent stimulation of Katanin ATPase activity (C). **Fig. S3** shows that MEI-1 phosphorylation (S92) is necessary and sufficient to target MEI-1 for degradation. **Fig. S4** shows the localization of Katanin during meiosis and mitosis on a fixed sample using immunostaining. **Fig. S5** shows multiple protein sequence alignment of p60 subunits. Table S1 is the list of plasmids used in this study. Table S2 is the list of worm lines used in this study.

Acknowledgments

We thank Ana Beatriz Diaz for early strain constructions. We thank P. Moussounda and R. Servouze for help with media preparation. We acknowledge the ImagoSeine core facility of the Institut Jacques Monod, member of IBSA and the France-BioImaging (ANR-10-INBS-04) infrastructure and the Institut Jacques Monod 'Structural and Fonctional proteomic platform.' We thank J. Dumont for sharing microscopy equipment. We thank B. Bowerman, A. Guichet, R. Karess, J. Dumont, B. Lacroix, and B. Ossareh-Nazari for critical reading of the manuscript. We also thank WormBase.

Some strains were provided by the Caenorhabditis Genetics Center (CGC), which is funded by the National Institutes of Health Office of Research Infrastructure Programs (P40 OD010440). E. Beaumale is supported by a PhD fellowship from the Ministry of Research. N. Joly was supported by an Association pour la Recherche sur le Cancer Project Fellowship and is

supported by funding "Dynamic Research" from Agence Nationale de la Recherche (ANR-18-IDEX-0001), Université de Paris excellency initiative (IdEx). Work in the laboratory of L. Pintard is supported by the French Agence Nationale de la Recherche under grant no. ANR-17-CE13-0011-01/01, by Ligue Contre le Cancer (Programme Equipes Labellisées). L. Pintard's team is also supported by Agence Nationale de la Recherche, laboratory excellence (LabEx) "Who Am I?" ANR-11-LABX-0071 and the Université de Paris IdEx ANR-18-IDEX-0001, through the "Investments for the Future" program.

The authors declare no competing financial interests.

Author contributions: N. Joly and L. Pintard designed the study. N. Joly and E. Beaumale performed GFP::MEI-2 localization in worms. L. Van Hove and N. Joly generated DNA constructs. E. Beaumale, L. Van Hove, L. Martino, and L. Pintard generated *C. elegans* lines and performed experiments in worms. N. Joly performed all remaining experiments and data analysis with E. Beaumale and L. Pintard. N. Joly, E. Beaumale, and L. Pintard assembled the figures. N. Joly and L. Pintard wrote the manuscript with input from all co-authors.

Submitted: 5 December 2019

Revised: 25 February 2020

Accepted: 3 March 2020

References

- Beard, S.M., R.B. Smit, B.G. Chan, and P.E. Mains. 2016. Regulation of the MEI-1/MEI-2 Microtubule-Severing Katanin Complex in Early *Caenorhabditis elegans* Development. *G3 (Bethesda)*. 6:3257–3268. <https://doi.org/10.1534/g3.116.031666>
- Bowerman, B., and T. Kurz. 2006. Degrade to create: developmental requirements for ubiquitin-mediated proteolysis during early *C. elegans* embryogenesis. *Development*. 133:773–784. <https://doi.org/10.1242/dev.02276>
- Brenner, S. 1974. The genetics of *Caenorhabditis elegans*. *Genetics*. 77:71–94.
- Cheng, K.C., R. Klancer, A. Singson, and G. Seydoux. 2009. Regulation of MBK-2/DYRK by CDK-1 and the pseudophosphatases EGG-4 and EGG-5 during the oocyte-to-embryo transition. *Cell*. 139:560–572. <https://doi.org/10.1016/j.cell.2009.08.047>
- Clark-Maguire, S., and P.E. Mains. 1994. Localization of the mei-1 gene product of *Caenorhabditis elegans*, a meiotic-specific spindle component. *J. Cell Biol.* 126:199–209. <https://doi.org/10.1083/jcb.126.1.199>
- DeRenzo, C., and G. Seydoux. 2004. A clean start: degradation of maternal proteins at the oocyte-to-embryo transition. *Trends Cell Biol.* 14: 420–426. <https://doi.org/10.1016/j.tcb.2004.07.005>
- Dow, M.R., and P.E. Mains. 1998. Genetic and molecular characterization of the *caenorhabditis elegans* gene, mel-26, a postmeiotic negative regulator of mei-1, a meiotic-specific spindle component. *Genetics*. 150:119–128.
- Frøkjær-Jensen, C., M.W. Davis, C.E. Hopkins, B.J. Newman, J.M. Thummel, S.P. Olesen, M. Grunnet, and E.M. Jørgensen. 2008. Single-copy insertion of transgenes in *Caenorhabditis elegans*. *Nat. Genet.* 40:1375–1383. <https://doi.org/10.1038/ng.248>
- Furukawa, M., Y.J. He, C. Borchers, and Y. Xiong. 2003. Targeting of protein ubiquitination by BTB-Cullin 3-Roc1 ubiquitin ligases. *Nat. Cell Biol.* 5: 1001–1007. <https://doi.org/10.1038/ncb1056>
- Gomes, J.E., N. Tavernier, B. Richaudeau, E. Formstecher, T. Boulin, P.E. Mains, J. Dumont, and L. Pintard. 2013. Microtubule severing by the katanin complex is activated by PPR-1-dependent MEI-1 dephosphorylation. *J. Cell Biol.* 202:431–439. <https://doi.org/10.1083/jcb.201304174>
- Han, X., J.E. Gomes, C.L. Birmingham, L. Pintard, A. Sugimoto, and P.E. Mains. 2009. The role of protein phosphatase 4 in regulating microtubule severing in the *Caenorhabditis elegans* embryo. *Genetics*. 181: 933–943. <https://doi.org/10.1534/genetics.108.096016>
- Hartman, J.J., and R.D. Vale. 1999. Microtubule disassembly by ATP-dependent oligomerization of the AAA enzyme katanin. *Science*. 286: 782–785. <https://doi.org/10.1126/science.286.5440.782>

Joly et al.

Regulation of Katanin by phosphorylation

Journal of Cell Biology

14 of 15

<https://doi.org/10.1083/jcb.201912037>

- Hartman, J.J., J. Mahr, K. McNally, K. Okawa, A. Iwamatsu, S. Thomas, S. Cheesman, J. Heuser, R.D. Vale, and F.J. McNally. 1998. Katanin, a microtubule-severing protein, is a novel AAA ATPase that targets to the centrosome using a WD40-containing subunit. *Cell*. 93:277-287. [https://doi.org/10.1016/S0092-8674\(00\)81578-0](https://doi.org/10.1016/S0092-8674(00)81578-0)
- Jiang, K., L. Rezabkova, S. Hua, Q. Liu, G. Capitani, A.F.M. Altelaar, A.J.R. Heck, R.A. Kammerer, M.O. Steinmetz, and A. Akhmanova. 2017. Microtubule minus-end regulation at spindle poles by an ASPM-katanin complex. *Nat. Cell Biol.* 19:480-492. <https://doi.org/10.1038/ncb3511>
- Johnson, J.L., C. Lu, E. Raharjo, K. McNally, F.J. McNally, and P.E. Mains. 2009. Levels of the ubiquitin ligase substrate adaptor MEL-26 are inversely correlated with MEL-1/katanin microtubule-severing activity during both meiosis and mitosis. *Dev. Biol.* 330:349-357. <https://doi.org/10.1016/j.ydbio.2009.04.004>
- Joly, N., L. Martino, E. Gigant, J. Dumont, and L. Pintard. 2016. Microtubule-severing activity of the AAA+ ATPase Katanin is essential for female meiotic spindle assembly. *Development*. 143:3604-3614. <https://doi.org/10.1242/dev.140830>
- Kuo, Y.W., O. Trottier, M. Mahamdeh, and J. Howard. 2019. Spastin is a dual-function enzyme that severs microtubules and promotes their regrowth to increase the number and mass of microtubules. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*. 116:5533-5541. <https://doi.org/10.1073/pnas.1818824116>
- Kurz, T., L. Pintard, J.H. Willis, D.R. Hamill, P. Cönczy, M. Peter, and B. Bowerman. 2002. Cytoskeletal regulation by the Nedd8 ubiquitin-like protein modification pathway. *Science*. 295:1294-1298. <https://doi.org/10.1126/science.106765>
- Li, W., L.R. DeBella, T. Guven-Ozkan, R. Lin, and L.S. Rose. 2009. An eIF4E-binding protein regulates katanin protein levels in *C. elegans* embryos. *J. Cell Biol.* 187:33-42. <https://doi.org/10.1083/jcb.200903003>
- Loughlin, R., J.D. Wilbur, F.J. McNally, F.J. Nédélec, and R. Heald. 2011. Katanin contributes to interspecies spindle length scaling in *Xenopus*. *Cell*. 147:1397-1407. <https://doi.org/10.1016/j.cell.2011.11.014>
- Lowry, O.H., N.J. Rosebrough, A.L. Farr, and R.J. Randall. 1951. Protein measurement with the Folin phenol reagent. *J. Biol. Chem.* 193:265-275.
- Lu, C., and P.E. Mains. 2007. The *C. elegans* anaphase promoting complex and MBK-2/DYRK kinase act redundantly with CUL-3/MEL-26 ubiquitin ligase to degrade MEL-1 microtubule-severing activity after meiosis. *Dev. Biol.* 302:438-447. <https://doi.org/10.1016/j.ydbio.2006.09.053>
- Lu, C., M. Srayko, and P.E. Mains. 2004. The *Caenorhabditis elegans* microtubule-severing complex MEL-1/MEL-2 katanin interacts differently with two superficially redundant beta-tubulin isoforms. *Mol. Biol. Cell*. 15:142-150. <https://doi.org/10.1091/mbc.e03-06-0418>
- Mains, P.E., K.J. Kempthues, S.A. Sprunger, I.A. Sulston, and W.B. Wood. 1990. Mutations affecting the meiotic and mitotic divisions of the early *Caenorhabditis elegans* embryo. *Genetics*. 126:593-605.
- McNally, F.J., and A. Roll-Mecak. 2018. Microtubule-severing enzymes: From cellular functions to molecular mechanism. *J. Cell Biol.* 217:4057-4069. <https://doi.org/10.1083/jcb.201612104>
- McNally, F.J., and R.D. Vale. 1993. Identification of katanin, an ATPase that severs and disassembles stable microtubules. *Cell*. 75:419-429. [https://doi.org/10.1016/0092-8674\(93\)90377-3](https://doi.org/10.1016/0092-8674(93)90377-3)
- McNally, K., A. Audhya, K. Oegema, and F.J. McNally. 2006. Katanin controls mitotic and meiotic spindle length. *J. Cell Biol.* 175:881-891. <https://doi.org/10.1083/jcb.200608117>
- Müller-Reichert, T., G. Greenan, E. O'Toole, and M. Srayko. 2010. The elegans of spindle assembly. *Cell. Mol. Life Sci.* 67:2195-2213. <https://doi.org/10.1007/s00018-010-0324-8>
- Nørby, J.G. 1988. Coupled assay of Na⁺, K⁺-ATPase activity. *Methods Enzymol.* 156:116-119. [https://doi.org/10.1016/0076-6879\(88\)56014-7](https://doi.org/10.1016/0076-6879(88)56014-7)
- Pang, K.M., T. Ishidate, K. Nakamura, M. Shirayama, C. Trzepacz, C.M. Schubert, J.R. Priess, and C.C. Mello. 2004. The minibrain kinase homolog, mbk-2, is required for spindle positioning and asymmetric cell division in early *C. elegans* embryos. *Dev. Biol.* 265:127-139. <https://doi.org/10.1016/j.ydbio.2003.09.024>
- Pellettieri, J., V. Reinke, S.K. Kim, and G. Seydoux. 2003. Coordinate activation of maternal protein degradation during the egg-to-embryo transition in *C. elegans*. *Dev. Cell*. 5:451-462. [https://doi.org/10.1016/S1534-5807\(03\)00231-4](https://doi.org/10.1016/S1534-5807(03)00231-4)
- Pintard, L., and B. Bowerman. 2019. Mitotic Cell Division in *Caenorhabditis elegans*. *Genetics*. 211:35-73. <https://doi.org/10.1534/genetics.118.301367>
- Pintard, L., T. Kurz, S. Glaser, J.H. Willis, M. Peter, and B. Bowerman. 2003a. Neddylated and deneddylated CUL-3 is required to target MEL-1/Katanin for degradation at the meiosis-to-mitosis transition in *C. elegans*. *Curr. Biol.* 13:911-921. [https://doi.org/10.1016/S0960-9822\(03\)00336-1](https://doi.org/10.1016/S0960-9822(03)00336-1)
- Pintard, L., J.H. Willis, A. Willems, J.L. Johnson, M. Srayko, T. Kurz, S. Glaser, P.E. Mains, M. Tyers, B. Bowerman, and M. Peter. 2003b. The BTB protein MEL-26 is a substrate-specific adaptor of the CUL-3 ubiquitin-ligase. *Nature*. 425:311-316. <https://doi.org/10.1038/nature01959>
- Quintin, S., P.E. Mains, A. Zinke, and A.A. Hyman. 2003. The mbk-2 kinase is required for inactivation of MEL-1/katanin in the one-cell *Caenorhabditis elegans* embryo. *EMBO Rep.* 4:1175-1181. <https://doi.org/10.1038/sj.embor.7400029>
- Rogerson, D.T., A. Sachdeva, K. Wang, T. Haq, A. Kazlauskaitė, S.M. Hancock, N. Huguenin-Desot, M.M. Muqit, A.M. Fry, R. Bayliss, et al. 2015. Efficient genetic encoding of phosphoserine and its nonhydrolyzable analog. *Nat. Chem. Biol.* 11:496-503. <https://doi.org/10.1038/nchembio.1823>
- Roll-Mecak, A., and F.J. McNally. 2010. Microtubule-severing enzymes. *Curr. Opin. Cell Biol.* 22:96-103. <https://doi.org/10.1016/j.cob.2009.11.001>
- Roll-Mecak, A., and R.D. Vale. 2006. Making more microtubules by severing: a common theme of noncentrosomal microtubule arrays? *J. Cell Biol.* 175:849-851. <https://doi.org/10.1083/jcb.200611419>
- Sambrook, J., E.F. Fritsch, and T. Maniatis. 1989. Molecular Cloning. A Laboratory Manual. Second edition. Cold Spring Harbor Laboratory Press, Cold Spring Harbor, NY.
- Sharp, D.J., and J.L. Ross. 2012. Microtubule-severing enzymes at the cutting edge. *J. Cell Sci.* 125:2561-2569. <https://doi.org/10.1242/jcs.101139>
- Shelton, C.A., and B. Bowerman. 1996. Time-dependent responses to glp-1 mediated inductions in early *C. elegans* embryos. *Development*. 122:2043-2050.
- Srayko, M., D.W. Buster, O.A. Bazirgan, F.J. McNally, and P.E. Mains. 2000. MEL-1/MEL-2 katanin-like microtubule severing activity is required for *Caenorhabditis elegans* meiosis. *Genes Dev.* 14:1072-1084.
- Srayko, M., E.T. O'Toole, A.A. Hyman, and T. Müller-Reichert. 2006. Katanin disrupts the microtubule lattice and increases polymer number in *C. elegans* meiosis. *Curr. Biol.* 16:1944-1949. <https://doi.org/10.1016/j.cub.2006.08.029>
- Stiernagle, T. 2006. Maintenance of *C. elegans*. *WormBook* doi/10.1895/wormbook.1.7.1. <http://www.wormbook.org>
- Stitzel, M.L., K.C. Cheng, and G. Seydoux. 2007. Regulation of MBK-2/Dyrk kinase by dynamic cortical anchoring during the oocyte-to-zygote transition. *Curr. Biol.* 17:1545-1554. <https://doi.org/10.1016/j.cub.2007.08.049>
- Stitzel, M.L., J. Pellettieri, and G. Seydoux. 2006. The *C. elegans* DYRK Kinase MBK-2 Marks Oocyte Proteins for Degradation in Response to Meiotic Maturation. *Curr. Biol.* 16:56-62. <https://doi.org/10.1016/j.cub.2005.11.063>
- Tavernier, N., A. Noatynska, C. Fanbianco, L. Martino, L. Van Hove, F. Schwager, T. Léger, M. Gotta, and L. Pintard. 2015. Cdk phosphorylates SPAT-1/Bora to trigger PLK-1 activation and drive mitotic entry in *C. elegans* embryos. *Journal of Cell Biology*. 208(6):661-669.
- Ueki, Y., T. Kruse, M.B. Weisser, G.N. Sundell, M.S.Y. Larsen, B.L. Mendez, N.P. Jenkins, D.H. Garvanska, L. Cressey, G. Zhang, et al. 2019. A Consensus Binding Motif for the PP4 Protein Phosphatase. *Mol. Cell*. 76:953-964.e6.
- Vemu, A., E. Szczesna, E.A. Zehr, J.O. Spector, N. Grigorieff, A.M. Deaconescu, and A. Roll-Mecak. 2018. Severing enzymes amplify microtubule arrays through lattice GTP-tubulin incorporation. *Science*. 361:eaau1504. <https://doi.org/10.1126/science.aau1504>
- Verhac, M.H., M.E. Terret, and L. Pintard. 2010. Control of the oocyte-to-embryo transition by the ubiquitin-proteolytic system in mouse and *C. elegans*. *Curr. Opin. Cell Biol.* 22:758-763. <https://doi.org/10.1016/j.cob.2010.09.003>
- Whitehead, E., R. Heald, and J.D. Wilbur. 2013. N-terminal phosphorylation of p60 katanin directly regulates microtubule severing. *J. Mol. Biol.* 425:214-221. <https://doi.org/10.1016/j.jmb.2012.11.022>
- Wu, Y., Q. Li, and X.-Z. Chen. 2007. Detecting protein-protein interactions by Far western blotting. *Nat. Protoc.* 2:3278-3284. <https://doi.org/10.1038/nprot.2007.459>
- Xu, L., Y. Wei, J. Reboul, P. Vaglio, T.H. Shin, M. Vidal, S.J. Elledge, and J.W. Harper. 2003. BTB proteins are substrate-specific adaptors in an SCF-like modular ubiquitin ligase containing CUL-3. *Nature*. 425:316-321. <https://doi.org/10.1038/nature01985>
- Zehr, E.A., A. Szyk, E. Szczesna, and A. Roll-Mecak. 2020. Katanin Grips the beta-Tubulin Tail through an Electropositive Double Spiral to Sever Microtubules. *Dev. Cell*. 52:118-131.e6.
- Zhang, D., G.C. Rogers, D.W. Buster, and D.J. Sharp. 2007. Three microtubule severing enzymes contribute to the "Pacman-flux" machinery that moves chromosomes. *J. Cell Biol.* 177:231-242. <https://doi.org/10.1083/jcb.200612011>

Downloaded from https://rupress.org/jcb/article-pdf/2019/12/201912037.pdf by guest on 20 July 2020

Supplemental material

Downloaded from https://rupress.org/jcb/article-pdf/219/6/2019/12037/1044-1381cb_201912037.pdf by guest on 20 July 2020

Joly et al.
Regulation of Katanin by phosphorylation

Journal of Cell Biology S1
<https://doi.org/10.1083/jcb.201912037>

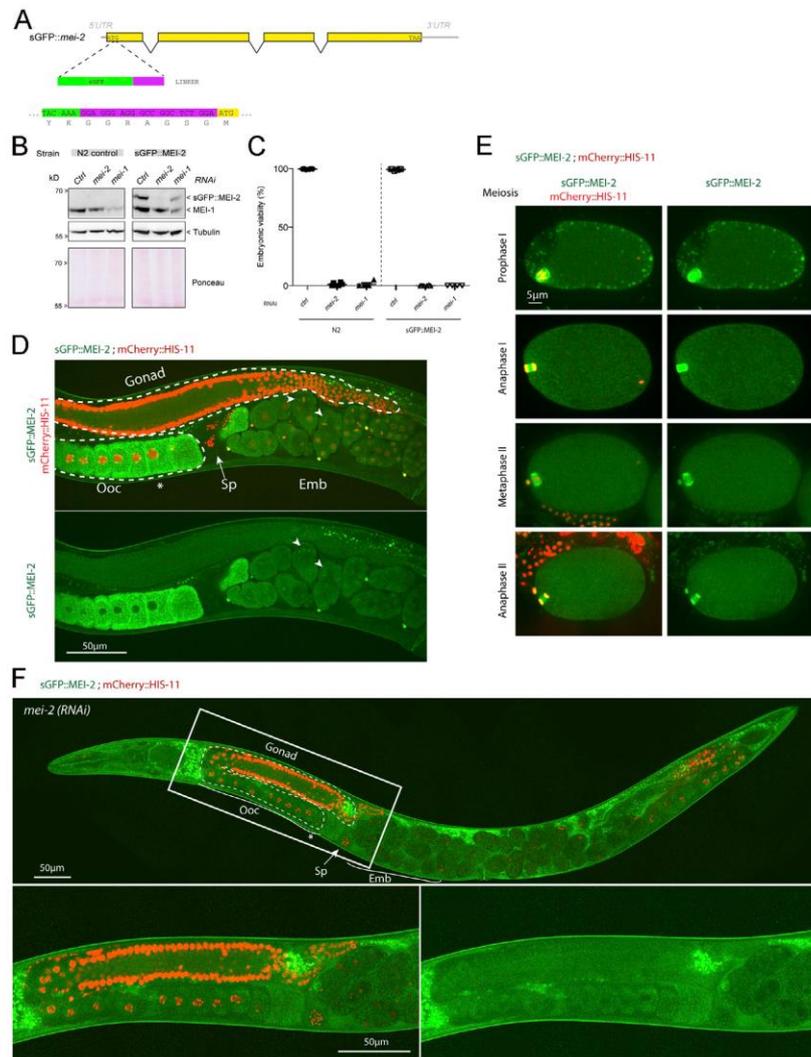


Figure S1. **Construction and characterization of a *C. elegans* line expressing endogenously tagged MEI-2 with sGFP.** (A) Schematics of the *mei-2* locus showing insertion of sGFP before the ATG initiation codon by CRISPR/Cas9-based genome editing. The nucleotide and protein sequence of the end of the sGFP (green) and the linker (purple) are indicated. (B) Western blot analysis of embryonic extracts from N2 or sGFP::MEI-2 strain exposed to mock (*control*), *mei-2*, or *mei-1* RNAi using GFP and MEI-1 antibodies (upper panel) and tubulin (middle panel) antibodies. The lower panel shows Ponceau staining of the membrane. (C) Graphs showing the percentage of viability of N2 or sGFP::MEI-2 strain exposed to mock (*Ctrl*), *mei-2*, or *mei-1* RNAi. Error bars represent SEM. $n = 4$ independent experiments performed in triplicate with >100 embryos each. (D) Spinning disk confocal micrographs of adult worm expressing sGFP::MEI-2 (in green) and mCherry::HIS-11 (in red) exposed to *control* RNAi. Arrowheads point to mitotic spindles. Sp, spermatheca; ooc, oocytes. The asterisk (*) indicates the -1 oocytes arrested in prophase of meiosis I. Note that in this worm, the oocytes adjacent to the spermatheca have resumed meiosis. (E) Spinning disk confocal micrographs of early embryos expressing sGFP::MEI-2 (in green) and mCherry::HIS-11 (in red) during meiosis. The anterior of the embryo is oriented toward the left in this and other figures. Scale bar represents 5 μ m. (F) Spinning disk confocal micrographs of adult worm expressing sGFP::MEI-2 (in green) and mCherry::HIS-11 (in red) exposed to *mei-2(RNAi)*. Insets are higher magnifications of the boxed regions. The full worm was reconstituted from ~10 different views and assembled using Photoshop. The germline is delimited by dashed lines. Sp, spermatheca; Ooc, oocytes; Emb, embryos; *, -1 oocyte. Scale bar represents 50 μ m.

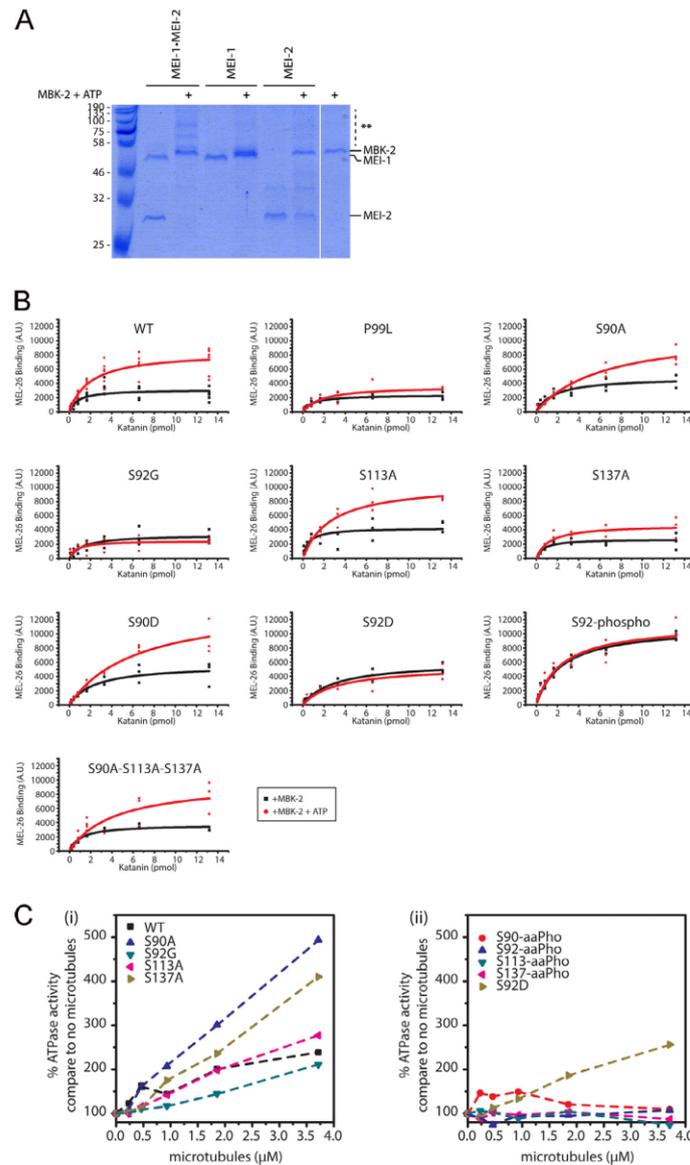


Figure S2. Phosphorylation of Katanin affects MEL-26 binding and its MT-dependent activity. (A) Qualitative analysis of phosphorylated Katanin on PhosTag SDS-PAGE. Katanin, MEI-1, or MEI-2 phosphorylated or not by MBK-2 ± ATP was separated on PhosTag SDS PAGE 7% to resolve the phosphorylated forms and revealed by Coomassie blue staining. (B) Quantitative analysis of MEL-26 binding to Katanin. Detailed quantification of the MEL-26 interaction detected on DotBlot membranes (presented in Fig. 4). Quantification was performed using ImageJ plugins. Raw values from at least three different experiments were plotted and analyzed using Origin. (C) Phosphorylation of the N-terminal Katanin region inhibits MT-dependent stimulation of Katanin ATPase activity. (Ci) Graphs showing the ATPase activity of Katanin WT and variants in the presence of increasing concentrations of MTs. (Cii) Graphs showing the ATPase activity of Katanin uniquely phosphorylated at specific sites (S-aaPho) compared with a Katanin variant harboring a phosphomimetic residue (S92D) in the presence of increasing concentrations of MTs.

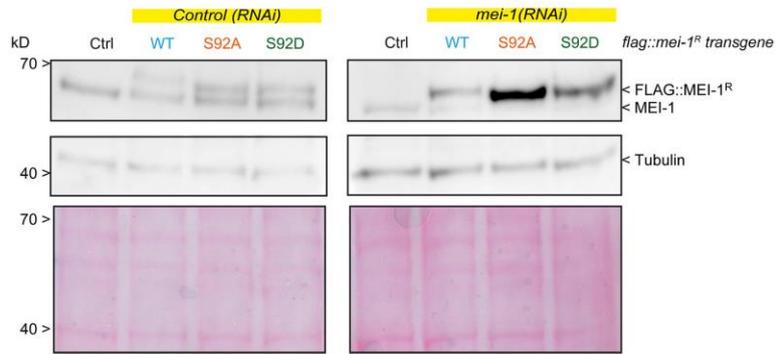


Figure S3. **MEI-1 phosphorylation (S92) is necessary and sufficient to target MEI-1 for degradation.** Western blot analysis of embryonic extracts from N2 (WT control, ctrl), FLAG::MEI-1 WT (light blue), FLAG::MEI-1 S92A (orange), and FLAG::MEI-1 S92D (green), animals exposed to mock (*control*) or *mei-1(RNAi)* using anti-MEI-1 (upper panel) and anti-tubulin (middle panel, loading control) antibodies. The lower panel shows Ponceau staining of the membrane.

Downloaded from <https://rupress.org/jcb/article-pdf/219/6/2019/12037/1041389.pdf> by guest on 20 July 2020

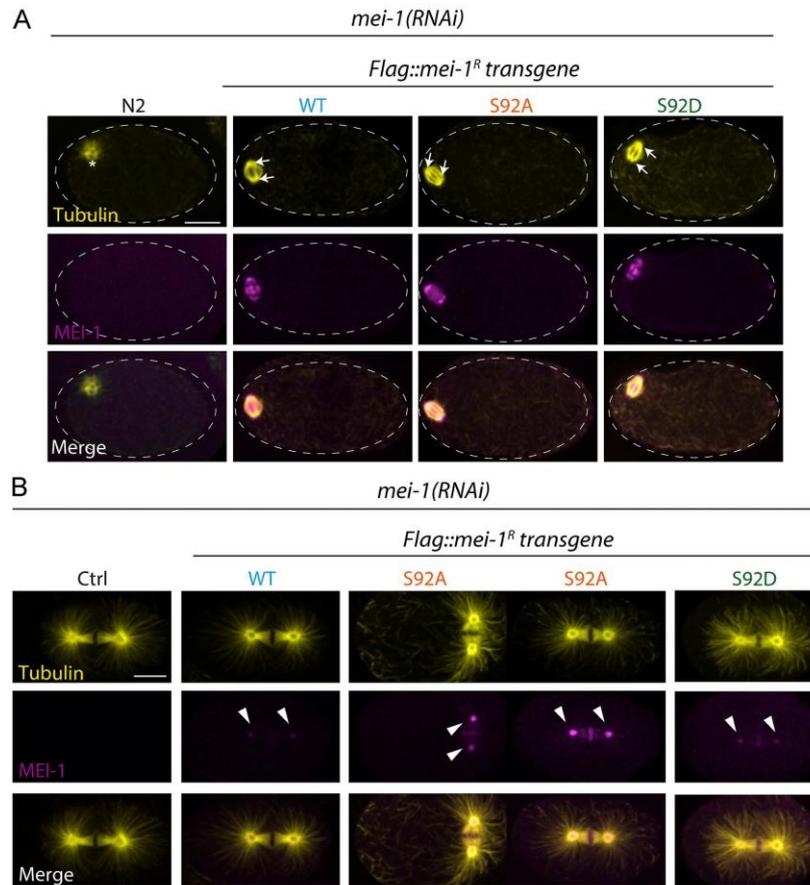


Figure S4. **Immunolocalization of Katanin during meiosis and mitosis.** Additional representative spinning disk confocal micrographs of fixed early embryos of the indicated genotype immunostained with anti-MEI-1 (magenta) and anti-tubulin (yellow) antibodies. White arrowheads indicate the persistence of MEI-1 in mitosis at the centrosomes and the chromosomes. **(A)** Meiotic embryos. **(B)** Mitotic embryos.

Downloaded from https://rpress.org/advance-article-pdf/doi/10.1083/jcb.201912037/10441389.pdf by guest on 20 July 2020

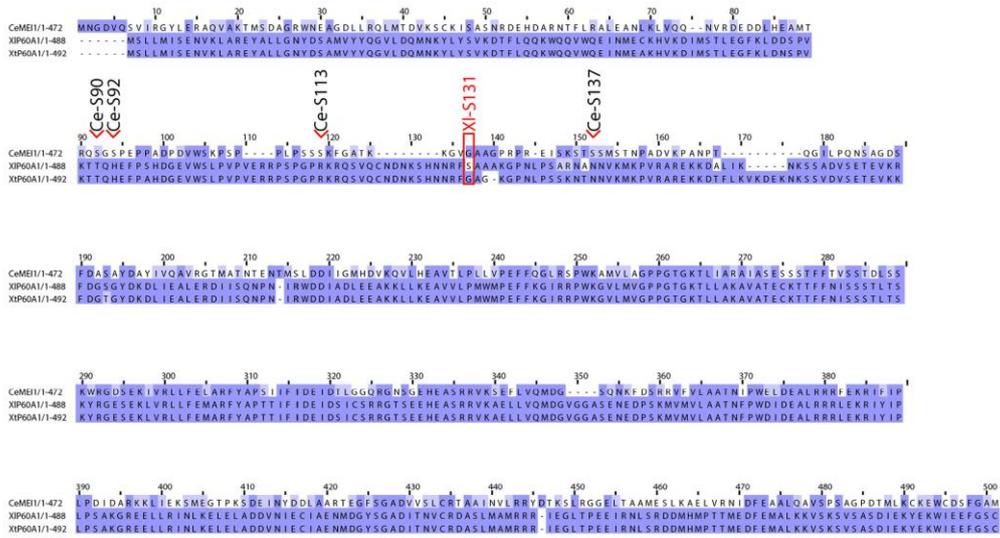


Figure S5. **Sequence alignment.** Protein sequence alignment of p60 subunit from *X. tropicalis*, *X. laevis*, and *C. elegans*. Red box marks S131 *X. laevis* phosphorylated residue identified in Loughlin et al. (2011). Ce-Sx point to serine identified in our study. Sequence references: *X. laevis* (NP_001084226.1), *X. tropicalis* (NP_001072433.1), and *C. elegans* (P34808.1)

Provided online are two tables. Table S1 lists the plasmids used in this study. Table S2 lists the transgenic worm lines used in this study.

Downloaded from https://rpress.org/article-pdf/219/6/2019/12037/1041389.pdf by guest on 20 July 2020

Identification and characterization of microtubule binding domain of Katanin essential for its function in *C. elegans* female meiosis

Beaumale E., Van Hove L., Pintard L., and Joly N. *In preparation*

Parmi la famille des « Microtubules Severing Enzymes », la Katanine est composée de deux sous-unités fonctionnelles. La sous-unité catalytique assure l'activité d'hydrolyse de l'ATP alors que la sous-unité régulatrice est responsable de l'interaction avec les microtubules et de la localisation subcellulaire de l'enzyme. Toutefois, les deux sous-unités sont essentielles à l'activité de coupure des microtubules de la Katanine. Elles doivent se coordonner de façon structurale et fonctionnelle pour assurer une activité de coupure des microtubules efficace. Chez *C. elegans*, la Katanine^{MEI-1•MEI-2} est requise pour l'assemblage du fuseau méiotique femelle. Un défaut d'activité de l'enzyme ne permet pas la formation d'un fuseau fonctionnel ce qui est létal pour le développement embryonnaire. Afin de comprendre comment la sous-unité régulatrice joue un rôle capital dans l'activité de la Katanine^{MEI-1•MEI-2}, cette étude vise à décortiquer le mode d'interaction directe de la Katanine^{MEI-1•MEI-2} avec les microtubules via la sous-unité MEI-2 chez *C. elegans*.

A l'aide d'un système minimal *in vitro* à partir de protéines purifiées, nous avons montré que la sous-unité régulatrice MEI-2 contient deux domaines distincts d'interaction aux microtubules. De plus, nous avons déterminé que chacun de ces domaines cible spécifiquement la tubuline α ou la tubuline β à la surface du microtubule pour interagir avec. Aussi, nous avons développé un système biologique fonctionnel chez *C. elegans* pour y introduire les mutations de la Katanine^{MEI-1•MEI-2} et analyser leurs conséquences sur l'activité de la Katanine^{MEI-1•MEI-2} au cours de la méiose femelle et du développement embryonnaire. En modifiant les charges des résidus impliqués dans cette interaction Katanine^{MEI-1•MEI-2}•microtubule, nous sommes en mesure de moduler l'affinité de la Katanine^{MEI-1•MEI-2} pour les microtubules qui a pour conséquence de nuancer l'activité de la Katanine^{MEI-1•MEI-2} sur l'assemblage d'un fuseau méiotique fonctionnel chez *C. elegans*. L'interaction de l'enzyme avec son substrat est donc un moyen efficace pour réguler l'activité enzymatique de la Katanine^{MEI-1•MEI-2}. Nous avons aussi montré que lorsque l'interaction avec les microtubules est défectueuse, un enrichissement en Katanine^{MEI-1•MEI-2} reste localisée autour du réseau de microtubules non structuré. Cela met en lumière le rôle capital de la sous-unité régulatrice MEI-2 dans l'interaction directe avec les microtubules mais aussi dans la localisation subcellulaire de la Katanine^{MEI-1•MEI-2}.

Dans cette étude, j'ai contribué à l'ensemble des manipulations conduisant aux résultats présentés dans l'article à l'exception des injections de vers pour la génération de nouvelles souches qui ont été réalisées par Lucie Van Hove.

Identification and characterization of Microtubule Binding Domains of Katanin essential for its function in *C. elegans* female meiosis

Eva Beaumale, Lucie Van Hove, Lionel Pintard and Nicolas Joly*

Université Paris Cité, CNRS, Institut Jacques Monod, F-75013, Paris, France

*Correspondence should be addressed to: nicolas.joly@ijm.fr

Highlights:

- Katanin binding to microtubule is dictated by its p80-like (MEI-2) subunit
- p80-like (MEI-2) binds microtubule via several basic patches
- Identification of three Microtubule Binding Motifs in p80-like (MEI-2)

Key Words: Meiosis, *C. elegans*, Katanin, Microtubule Severing Enzyme, Microtubule interaction motifs

Abstract

The Microtubule-severing enzymes (MSEs) Katanin, Spastin and Fidgetin are evolutionarily conserved related AAA+ ATPase (ATPase Associated with diverse cellular Activities) with critical functions in cell division and neurogenesis. MSEs interact with and damage the microtubule (MT) lattice leading to the reduction or amplification of the MT cytoskeleton, depending on the cellular context. Despite their importance to cell physiology, how MSEs interact with their substrates, microtubules, is still poorly understood. Here, we identified the MicroTubule-Binding Domains (MTBD) required for Katanin function in *C. elegans*. Unlike Spastin and Fidgetin, Katanin is a hetero-hexamer of dimers containing a catalytic subunit p60 and an accessory subunit p80, which are both essential for female meiotic spindle assembly in *C. elegans* (MEI-1 and MEI-2 respectively). We showed that p80-like(MEI-2) dictates Katanin binding to MTs at least via two MTBDs composed of basic patches. Substitution of these patches with apolar or acidic residues reduced or abolished Katanin binding to MTs *in vitro*, and compromised Katanin function in female meiotic spindle assembly. Strikingly, the most severe phenotypes are observed for the p80-like(MEI-2) variants with acidic patches. Structural alignments of p80-like(MEI-2) with p80s from different species revealed that the MTBDs are evolutionarily conserved, even if amino acids have evolved. Our findings highlight the critical importance of the “accessory” subunit (p80) in providing primary MT-binding to the Katanin complex.

Introduction

Microtubules (MTs) are highly dynamic cellular structures with critical roles in numerous cellular processes, including cell motility, cellular transport, or cell division. Microtubules' function depends on their dynamical behavior that is controlled by Microtubule-Associated Proteins (MAPs). Microtubule Severing Enzyme (MSE) is a sub-class of MAPs that directly targets the microtubule lattice^{1,2}. MSEs are part of AAA+ ATPase (ATPase Associated with diverse cellular Activities) family and comprise three conserved enzymes: Fidgetin, Spastin, and Katanin¹⁻⁶.

Recently, our understanding of the mode of action of MSEs, previously reported as Microtubule “Severing” Enzymes, has been revisited⁷. While it was believed that MSE only sever microtubules thereby dismantling the MT network Vemu *et al* have shown that MSE might also promote MT nucleation in certain conditions⁷. Indeed, they showed that MSEs use ATP hydrolysis via their conserved AAA+ domain to damage the MT-lattice. Depending on the cellular context, MTs can either be repaired by incorporating GTP-tubulin, leading to the formation of “stable” microtubules, or weakened leading to MT-severing and the formation of new microtubules ends⁷. These ends might depolymerize to dismantle the microtubule or be used as seeds to polymerize new microtubules, if GTP-tubulin is available^{3,7,8}.

Despite this breakthrough, how microtubule-severing enzymes primarily interact with microtubules is still poorly understood. The molecular determinants promoting this interaction are not known. The only clear domain required for MSE•microtubules interaction has been reported for Spastin⁹. However, sequence analysis did not allow the identification of such motifs in Fidgetin or Katanin.

In contrast to Spastin and Fidgetin, which are organized as homo-hexamers, Katanin is composed of two subunits: a p60 catalytic subunit containing the AAA+ domain (Walker A and B motif allowing respectively to bind and to hydrolyze ATP) and a p80 “regulatory” subunit previously shown to dictate Katanin cellular localization^{10-12 13}. The hetero oligomeric organization of Katanin is adding complexity for the identification of MTBD, which might be present in either p60, p80 or formed by the interaction between the two subunits.

Using structural approaches, Zehr *et al.* have shown that the central pore formed by p60 AAA+ domain hexamerisation engages the acidic C-terminal tail (CTT) of tubulin¹⁴. This interaction is required for microtubule severing, but whether it constitutes the primary binding site is not known. If that interaction constituted the sole Katanin-microtubule interaction, it would imply that the Katanin

hexamer would land on the microtubules directly engaging the C-terminal tail (CTT). Alternatively, other MT-binding domains could first dock the catalytic subunit on MT and optimally position the central pore of the enzyme on the CTT of the microtubules. In support of this hypothesis, we previously reported that p80-like (MEI-2) alone binds microtubules in pull-down assays, suggesting that this protein contains a *bona fide* MTBD¹⁵. However, based on sequence analysis, no obvious MTBD motif could be predicted.

In support of a major role of p80 in the function of the Katanin, mutations of p80 lead to major cellular defects linked to human diseases such as congenital cortical malformations, sterility or cancer^{12,16}. Nevertheless, how these mutations affect the activity of the enzyme is not understood. In addition, Srayko et al have shown that the depletion of p80-like (MEI-2) in *C. elegans* results in a complete loss of function of Katanin preventing the formation of the meiotic spindle, strongly suggesting the critical role of p80 in the function of Katanin¹⁷.

P80 subunit is invariably composed of a Con80 domain (for CONserved domain) which can be complemented by a WD40 domain¹. This WD40 domain is involved in protein-protein interaction¹⁸ and has been shown to play a role in targeting Katanin to its cellular localization for optimal function^{10,11}.

Here, we dissected the precise contribution of the p80-like (MEI-2) subunit (hereafter MEI-2) to Katanin activity using *C. elegans* as a model system. In this system, inactivation of both Katanin subunits (MEI-1 or MEI-2) results in a similar failure in meiotic spindle assembly causing embryonic lethality^{17,19}. However, partial reduction of Katanin function causes the assembly of a longer meiotic spindle giving rise to the extrusion of abnormally large polar bodies after cytokinesis^{15,17,19-21}. As Katanin activity is essential for the assembly of the meiotic spindle, monitoring the formation and the size of the polar body provides a quantifiable readout to monitor Katanin activity *in vivo*. Here, by combining *in vitro* approaches with structure-function analysis *in vivo*, we revealed that MEI-2 binds MT through two MT-binding domains (MTBDs) composed of basic patches. We also show that MEI-1 interacts with MT but exclusively in the presence of MEI-2, strongly suggesting that MEI-2 brings the catalytic subunit in the vicinity of MT. In addition, we demonstrate that reducing MEI-2-binding to MT causes major defects in Katanin function *in vivo*, strongly suggesting that MEI-2•MT interaction is critical for optimal Katanin activity *in vivo*.

Taken together, our findings demonstrate that the p80 “regulatory” subunit provides MT-binding to the Katanin complex thereby promoting optimal MT-severing *in vivo*.

Results

p80(MEI-2) subunit dictates Katanin binding to microtubules

To establish which subunit promotes initial Katanin binding to MT, we tested whether p60(MEI-1) or p80-like(MEI-2) is responsible for this interaction.

To do so, we set up an *in vitro* interaction assay (**Figure 1A**) in which we mixed purified Katanin and microtubules in the presence of the EDC cross-linker (1-éthyl-3-[3-diméthylaminopropyl] carbodiimide hydrochloride), allowing us to resolve covalent complexes between Katanin and MTs by SDS-PAGE if a Katanin•MT interaction occurs. To identify the protein present in each complex and reveal the identity of the cross-linked subunits to microtubules, we performed the cross-linking experiment using MEI-1 alone or by changing the size of MEI-1 or MEI-2 using different tags or truncation variants (**Figure 1B and C**).

First, we exposed Katanin to EDC and did not observe differences compare to the control condition in absence of EDC (**Figure 1B** compare lanes 2 and 3). From these results, we concluded that no cross-linked species were formed between MEI-1*MEI-1, MEI-1*MEI-2 or MEI-2*MEI-2, most likely due to the absence of “compatible” residues (K, E, D) at the level of these subunit interfaces. Then, we mixed Katanin with MTs in the presence of EDC and observed a specific band migrating around 100kDa (red asterisk - **Figure 1B** compare lanes 4 to 1-2-3). This band was only detectable when Katanin was incubated with MTs. Based on its size (around 100kDa), we hypothesized that this band is composed of MEI-2 (33kDa) and Tubulin (around 60kDa). To test this hypothesis, we repeated the experiment with a shorter version of MEI-2: MEI-2¹⁻¹⁵³ (25kDa vs 33kDa for MEI-2¹⁻²⁸⁰) and observed that the cross-linked band was downshifted accordingly (75kDa), demonstrating the presence of MEI-2¹⁻¹⁵³ (red asterisks - **Figure 1B** compare lane 7 to 4). From these observations, we conclude that MEI-2 directly interacts with MTs.

In addition, we observed a band migrating around 120kDa, which is similar in size to a band produced by the crosslink of tubulin moieties in the control experiment (tub x tub - **Figure 1B** lane 1). However, the intensity of this band specifically increased in the presence of Katanin (**Figure 1B** lane 4 and 7), suggesting some changes in the cross-linked species. Based on its size, we hypothesized that this band could correspond to different cross-linked complexes: either tubulin*tubulin, MEI-1*MEI-1 or MEI-1*tubulin. To reveal its composition, we modified the molecular weight of MEI-1 using a GFP tag (GFP-MEI-1: 80kDa vs 55kDa for MEI-1). In this context, the cross-linked band was upshifted (around 140kDa) when MTs were mixed with GFP-MEI-1•MEI-2 but not with GFP-MEI-1 alone (green asterisk - **Figure 1C** compare lane 10 to 4-7 and 13). We confirmed the presence of tubulin in this

upshifted band by western blot (**Figure 1C** - bottom panel). From this observation, we conclude that MEI-1 interacts with microtubules but only when MEI-2 is present.

Taken together, these results establish that MEI-2 primarily interacts with MTs, allowing MEI-1•MT interaction to occur. These observations also suggest that MEI-2 brings MEI-1 in proximity of MTs to promote the interaction between the central pore of MEI-1 and the tubulin-CTT required for substrate remodeling.

Katanin^{MEI-1-MEI-2} binds to microtubules via two distinct MT-binding domains in MEI-2

We next aimed to identify the MT-Interacting Domain (MTBD) of MEI-2, allowing Katanin•MTs interaction.

To this end, we produced and purified 20 different MEI-2 fragments spanning the N-terminal part, the central region and the C-terminal part and tested their ability to interact with MT using EDC cross-link experiments (**Figure 2A**). We observed that the N-terminal (MEI-2¹⁻⁷⁰) and the C-terminal part of MEI-2 (MEI-2²⁴¹⁻²⁸⁰) cross-linked with MTs while no cross-link could be detected using the central region of MEI-2 (MEI-2⁷⁰⁻²⁴⁰; **Figure 2B** compare lanes 5-8-11 and 14 and **Supplementary Figure S2**).

We thus conclude that MEI-2 binds to MTs via two MTBDs located in MEI-2¹⁻⁷⁰ (MTBD1) and MEI-2²⁴¹⁻²⁸⁰ (MTBD2).

Next, we analyzed the MEI-2*tubulin cross-linked band (**Figure 2C** - red box) with mass spectrometry to map interacting sites on MEI-2 and MTs and to determine whether MEI-2 targets a specific site at the surface of MTs. We identified two cross-linked sites on MEI-2 (K78 and K274) targeting two distinct sites on tubulins (beta-tubulin TBB E108 or TBB-5 E111, and alpha-tubulin TBA-1 and TBA-2 D392; respectively **Figure 2D**). Interestingly, the apparent molecular weight of the band extracted from SDS PAGE corresponds to one MEI-2 moiety and one tubulin cross-linked (MEI-2*tubulin about 130kDa – MBP-MEI-2 70kDa + tubulin 60kDa). We concluded that MEI-2 interacts with the globular domain of a single tubulin at a time, and that each MEI-2 lysine binds specifically to either alpha- or beta-tubulin.

From these results, we conclude that MEI-2 directly interacts with MTs via at least two distinct MTBDs, which target specific alpha- or beta-tubulin on their globular domain.

Basic residues of MEI-2 are involved in direct Katanin^{MEI-1-MEI-2}-microtubule interaction

To further characterize Katanin•MT interaction, we aimed to identify key residues of MEI-2 allowing this interaction. Guided by the cross-linking and mass spectrometry experiments (**Figure 2**), we observed that the cross-linked lysines (K) identified in MEI-2 were organized in pair (K77-K78, K274-K275) and that a KK pair was also present in MTBD1 (MEI-2¹⁻⁷⁰ ; K8 K9). Thus, we substituted positively charged lysine pairs of both minimal MEI-2 interacting fragments identified (MEI-2¹⁻⁷⁰ and

MEI-2²⁴⁰⁻²⁸⁰) either with apolar (Alanine-A) or negatively charged residues (Aspartate-D) and tested their interaction with MTs using cross-link experiments (**Figure 3A and B**).

While cross-linked bands were observed in the context of WT fragments, substituting K8-K9 or K274-K275 reduced the amount of MEI-2*tubulin cross-link formed, with a more pronounced effect observed with Aspartate substitutions compared to Alanine (**Figure 3A**, compare lanes 7 to 5 and 3 and **Figure 3B** compare lanes 7 to 5 and 3).

We then introduced these substitutions in MEI-2 full length (MEI-2^{FL} K8A-K9A K274A-K275A and K8D-K9D K274D-K275D). We observed that even with Aspartate substitutions at all four positions, which almost abolish the interaction in the context of the fragments, the characteristic MEI-2*tubulin band was reduced but still present using MEI-2^{FL} (**Figure 3C** lane 7), suggesting the presence of other microtubule interacting motif(s).

Based on the mass spectrometry results revealing crosslink of K77-K78 pair which is only present in MEI-2^{FL} but not in MTBD1 and MTBD2, we hypothesized that these residues were playing a role in the interaction with MTs. The presence of the K77-K78 pair in the MEI-2⁷⁰⁻²⁴⁰ fragment was not sufficient to observe stable MEI-2•MT interaction (**Figure 2B** lane 11) while its presence in the MEI-2^{FL} K8D-K9D K274D-K275D (**Figure 3C** lane 7) was, strongly suggesting that K77-K78 depends on its environment to interact with the MT. We tested this hypothesis by extending the minimal N-terminal fragment MEI-2¹⁻⁷⁰ to MEI-2¹⁻⁹⁰ to comprise the K77-K78 pair identified by Mass Spectrometry. While the substitution of this motif alone was not sufficient to completely abolish the interaction with MT (**Figure 3D** lanes 9-11), in combination with K8-K9, the MEI-2¹⁻⁹⁰*tubulin band was not detectable (**Figure 3D** lane 16).

We conclude that the K77-K78 pair is playing an essential role in MEI-2•MT interaction but that its function is sensitive to the flanking regions.

Then, we substituted the three Lysine pairs in full-length MEI-2. As expected, the simultaneous substitution of the six Lysines, by Alanine (K8A-K9A K77A-K78A K274A-K275A; **Figure 3E**, compare lane 5 to 3) or Aspartate (K8D-K9D K77D-K78D K274D-K275D; **Figure 3E** compare lane 7 to 3) strongly reduced the MEI-2*tubulin cross-linked band with a more pronounced effect observed with Aspartate substitutions. We observed similar results when MEI-2 was in complex with MEI-1 (Katanin - **Supplementary Figure S1**).

From these results, we conclude that the three positively charged KK motifs independently contribute to MEI-2•MT interaction as substituting only one patch is not sufficient to drastically affect MT-binding *in vitro*.

MEI-2 basic patches are critical for Katanin^{MEI-1-MEI-2} function *in vivo*

Having identified key residues in MEI-2 allowing Katanin•MT interaction *in vitro*, we next asked whether these residues contribute to Katanin function *in vivo*. *C. elegans* is an ideal model organism for measuring Katanin activity *in vivo*. As introduced earlier, loss of Katanin function leads to severe defects in meiotic spindle assembly resulting in embryonic lethality^{19,22,23}. However, partial loss of Katanin activity is not lethal but often causes the assembly of a longer meiotic spindle, which is accompanied by the extrusion of a larger polar body^{19,24-27}. The system is therefore very sensitive and allows the monitoring of even minor defects in Katanin activity.

Thus to analyze the role of MEI-2 MicroTubule Binding Domains (MTBDs) *in vivo*, we generated worm lines expressing *sGFP::mei-2 Recoded* (*sGFP::mei-2^R* - RNAi-resistant transgene) wild-type (WT) or with different combinations of MTBD Lysines substituted by Alanine or Aspartate [K77A-K78A], [K77D-K78D], [K274A-K275A], [K274D-K275D] or in combination 4A [K77A-K78A K274A-K275A], 4D [K77D-K78D K274D-K275D], 6KA [K8A-K9A K77A-K78A K274A-K275A], 6KD [K8D-K9D K77D-K78D K274D-K275D] (**Figure 4A**).

We then tested the ability of these transgenes to rescue the lethality and large polar body phenotype typically observed upon endogenous *mei-2* depletion by RNAi (**Figure 4B** and **4C**) validating the approach. *sGFP::mei-2^R* WT transgene was able to fully rescue the lethality and the large polar body phenotypes induced by RNAi depletion of the endogenous *mei-2* (**Figure 4B** and **4C**). Likewise, *sGFP::mei-2^R* with single pair substitutions [K77A-K78A], [K77D-K78D], [K274A-K275A] and [K274D-K275D] only had a moderate effect on embryo viability (90% to 70% viability) and most of these constructs rescued the lethality associated with endogenous *mei-2* inactivation (**Figure 4B**). Notably, a more pronounced lethality phenotype was observed for embryos with Aspartate substitutions (**Figure 4B**).

Interestingly, the combination of both pair substitutions by Alanine [K77A-K78A K274A-K275A] drastically reduces the viability of the embryo to 50% while the same residues substituted by Aspartate [K77D-K78D K274D-K275D] did not support embryo viability (0% viability) (**Figure 4B**). This result strongly suggests that the basic patches act synergistically to promote Katanin binding to MTs and to allow productive interaction to occur.

As our *in vitro* experiments indicated that combining substitution of the basic patches is necessary to drastically affect MEI-2 binding to MTs, we tested *sGFP::mei-2^R* transgenes with the 6 Lysine (K) substituted. Both *sGFP::MEI-2^R* 6KA and 6KD were expressed at normal levels in the germline, with an expression pattern indistinguishable from the wild-type (**Figure Supplementary S2**). We observed a more drastic reduction of the embryo viability for 6KA (15% viability) than for [K77A-K78A K274A-K275A] (50% viability), and no differences between 6KD and [K77D-K78D K274D-K275D] as the

two constructs are exhibiting 0% viability (**Figure 4B**). Interestingly, and in agreement with *in vitro* observations showing less microtubule binding for the 6KD compare to 6KA (**Figure 3E**), the phenotype observed for the 6KD (0% viability) is more pronounced than for 6KA (15% viability; **Figure 4B**).

From these results, we concluded that the embryonic lethality observed is due to a default of Katanin activity and not to the absence of Katanin. In addition, we concluded that the presence of acidic substitutions as a more pronounced phenotype than a neutral substitution, most likely due to a “repulsion” effect preventing completely the productive interaction already when only four lysines are substituted.

As Katanin is essential for female meiosis, we suspected that the high embryo lethality was due to a major defect in meiotic spindle assembly. To test this hypothesis, we monitored the size of the polar bodies (**Figure 4C and 4D**) in WT, 6KA and 6KD lines upon *mei-2* depletion by RNAi. For both strains (6KA and 6KD), we observed 100% of large polar bodies (**Figure 4C**). Strikingly, even if both strains exhibit large polar bodies, embryonic viability differs (15% vs 0% respectively for sGFP::MEI-2^R 6KA and sGFP::MEI-2^R 6KD), suggesting that for the strain containing sGFP::MEI-2^R 6KA, Katanin activity is reduced but not completely abolished. This reduced activity most likely results in the formation of altered meiotic spindle that are sufficient to achieve correct chromosome segregation. By measuring the perimeter of polar bodies of each embryo (**Figure 4D**), we revealed a more severe phenotype for the sGFP::MEI-2^R 6KD. Indeed, we observed that polar bodies in sGFP::MEI-2^R 6KD embryos are significantly bigger than ones in sGFP::MEI-2^R 6KA embryos. Moreover, we observed the presence of multiple nuclei in sGFP::MEI-2^R 6KD embryos (**Figure 4C**, 6KD, white asterisk) as a consequence of chromosome segregation defect during meiosis.

Next, we wondered whether 6KA or 6KD substitutions could have an impact on Katanin cellular expression and localization. We have previously shown using indirect immunofluorescence experiments that catalytically inactive MEI-1 mutants, defective in meiotic spindle assembly are still detected in the vicinity of meiotic chromosomes¹⁵. Likewise, we found that GFP-MEI-2^R 6KA and 6KD were detected, together with MEI-1 in the vicinity of the meiotic chromosomes (**Figure 5**), unable to assemble on a bipolar meiotic spindle. These observations suggest that MEI-2 6KA and 6KD substitutions are not affecting the assembly, cellular stability or localization of Katanin but only its activity, by preventing Katanin binding to microtubules.

From these results, we conclude that the presence of intact MTBDs in MEI-2 is required for Katanin function during female meiotic spindle assembly.

Discussion

In this study, we demonstrated that MEI-2 (p80-like) provides Katanin binding to MTs. Using protein fragmentation, site-directed mutagenesis and EDC cross-linking experiments, we revealed the existence of multiple MT-binding sites on MEI-2. By coupling the EDC cross-link with mass spectrometry, we identified precise targeted sites at the surface of the MT in the globular domain of alpha- and beta-tubulins. Then, we tested the importance of the identified motifs for Katanin activity by introducing Katanin variants into *C. elegans* and monitored polar body formation as a readout. Doing so, we revealed the importance of the identified MTBDs not only for MTs interaction *in vitro* but also for optimal Katanin activity *in vivo*. Interestingly, based on our biochemical characterization of Katanin•MTs interaction, we were able to modulate Katanin activity *in vivo* by using Katanin variants harboring different affinities for MTs.

Our study also revealed that after initial binding of Katanin on MTs via MEI-2, thus MEI-1 is brought at a close proximity of the MTs and directly contact them. We speculate that this MT vicinity is allowing MEI-1 to engage in a “productive” interaction with the MT to damage it (model in **Figure 6C**). From the structure of MEI-1 AAA+ domain associated with C-terminal acidic tubulin tail reported by Zehr et al ¹⁴, we propose that this “secondary interaction” might occur between the p60 hexamer central pore residues and the C-terminal exposed tail of tubulin to allow tubulin remodeling in an ATP hydrolysis dependent manner, leading to MT damage.

Conservation of the folding

Having precisely identified MTBDs allowing MEI-2 to interact with the MTs, we asked whether these motifs were conserved within the p80s. In contrast to the protein sequence alignment which does not reveal an obvious conserved motif (**Figure 6A**), we performed structural modeling of p80 and p80-like from *C. elegans*, *Homo sapiens*, *Mus musculus*, *Drosophila melanogaster* and *Arabidopsis thaliana* using alphaFold2 (**Figure 6B** and **Supplementary Figure S4**). First, we observed that the *C. elegans* MEI-2 modeling is revealing two distinct domains in MEI-2: an N-terminal domain highly unstructured and a C-terminal domain more stable. Structural alignment of the C-terminal “stable” domain for several p80s show the clear conservation of the organization of this “stable” region corresponding to MEI-2 MTBD2. From this observation, we propose that the motif identified using MEI-2 as model might also be present in the p80 subunits of the other species implying that the role of p80 to initiate Katanin•MTs interaction could be conserved.

Interestingly, one explanation for the conservation of the global organization but not of the protein sequence could be the differences of tubulin sequences and isoforms from the different species. We

speculate that the sequences corresponding to the MTBD present in the different p80s could be used to recognize specific tubulin isoforms in a specific cellular context, leading to some Katanin•MT interaction specificity.

Katanin•microtubule interaction model

From our results, we propose a Katanin•MT interaction model. We have previously shown that Katanin (MEI-1 MEI-2) is assembled as a hexamer of dimer¹⁵. We propose that one MEI-2 is making an initial interaction with the globular region of the tubulin (from cross-link and Mass spectrometry results). Then, a secondary interaction between a second MEI-2 present in Katanin oligomer will allow the stabilization and the optimal positioning of the MEI-1 catalytic ring at the surface of the MT (observation of new cross-link between MEI-1 and tubulin). Doing so, MEI-1 hexamer central pore will be at a close vicinity of the charged CTT of tubulin exposed at the surface of the MT, allowing its engagement in the central pore. This model is consistent with our previous results showing that the presence of MEI-2 is required for Katanin activity and previously reported studies showing that the presence of charged CTT is stimulating the ATPase activity of the catalytic ring and that the presence of p80 is enhancing the microtubule severing activity *in vitro*.

Multiple role of MEI-2•tubulin interaction

We observed that MEI-2 is directly interacting with the globular region of the tubulins. This interaction is then leading to the interaction between MEI-1 and the tubulin CTT. If our results clearly demonstrate that the role of MEI-2 is to initiate the Katanin•MT interaction, they are also suggesting that MEI-2 could play another role, this time at the level of the catalytic activity of the complex. Indeed, single MEI-2 substitutions did not lead to significant difference in the binding of MEI-2 to the MTs *in vitro* while they had a clear impact on the formation of the polar body *in vivo*. In addition, Lu et al have previously reported using genetic approach in *C. elegans*, that the presence of a single mutation in the globular region of alpha-tubulin (TBA-2) was drastically reducing Katanin activity, suggesting that this region of tubulin was involved in Katanin•MT contact²⁸. From these observations, we propose that MEI-2•microtubule interaction could have two roles: i) to bring the catalytic subunit MEI-1 in close proximity to the tubulin CTT and ii) to modulate the activity of Katanin. We speculate that the modulation of Katanin activity could be due to the optimal interaction between MEI-2 and the tubulin globular domain and that modifying this critical interaction will not lead to the “disassociation” of the Katanin from the microtubule but “only” to the less productive use of ATP hydrolysis energy leading to MT remodeling and thus severing. This interaction will be used to efficiently couple the ATP hydrolysis to substrate remodeling. Impacting this interaction will lead to un-optimal Katanin activity leading to the formation of large polar body, for example, without affecting the subcellular localization of the

Katanin. From this respect, we propose a multi-step MT severing mechanism involving sequentially the different type of subunits: (i) binding of MT by MEI-2 bringing MEI-1 at proximity to the MT lattice, (ii) tubulin CTT engagement into the central pore formed by MEI-1 hexamer leading to the triggering of ATP hydrolysis, (iii) ATP hydrolysis within the MEI-1 hexamer is leading to major conformational changes relayed by MEI-2 to the MT (iv) optimal interaction between MEI-2 and tubulin globular domain allows conformational changes to be relayed affecting tubulin organization and microtubule structure, (v) extraction of tubulin dimer damaging the MT lattice.

Taken together, these results strongly suggest the role of MEI-2•MT interaction will not only be to bring the Katanin at the close proximity of the MT lattice but that the nature of the interaction between tubulin and Katanin is able to modulate the activity of the enzyme even if the “interaction” per se is not drastically affected.

Acknowledgments

We thank P. Moussounda for her help with media preparation. We thank C. Gaucher, N. Baouz, J. Lopez and L. Guichet for administrative and research support. We acknowledge the ImagoSeine core facility of the Institut Jacques Monod, member of IBISA and the France-BioImaging (ANR-10-INBS-04) infrastructure and the Institut Jacques Monod ‘Structural and Functional proteomic platform’. We thank Joelle Morvan, Roger Karess, Batool Ossareh-Nazari and Griselda Velez Aguilera for critical reading of the manuscript. Some strains were provided by the Caenorhabditis Genetics Center (CGC), which is funded by NIH Office of Research Infrastructure Programs (P40 OD010440). We also thank WormBase. EB was supported by a PhD fellowship from the Ministry of Research and by the Fondation ARC pour la recherche sur le cancer. NJ was supported by an ARC project Fellowship and is supported by a funding “Dynamic Research” from ANR-18-IDEX-0001, IdEx Université de Paris. Work in the laboratory of LP is supported by the French National Research Agency under grant no. ANR-17-CE13-0011-01/01, by la Ligne Nationale Contre le Cancer (Programme équipe labélisée). LP team is also supported by the Labex “Who am I?” Laboratory of Excellence No. ANR-11-LABX-0071, the French Government through its Investments for the Future program operated by the French National Research Agency (ANR) under Grant no. ANR-11-IDEX-0005-01.

Author Contributions

E.B. and N.J. designed the study. E.B., and N.J. generated DNA constructs, protein purifications and cross-linking assays. E.B, L.V.H and L.P. generated worm strains and performed immuno-staining localization. E.B. and N.J. performed spinning disk experiments. E.B. performed all remaining experiments and data analysis with N.J. E.B., L.P. and N.J assembled the Figures. E.B., L.P. and N.J. wrote the manuscript with input from all co-authors.

Declaration of Interests

The authors declare no competing interests.

Materials & Methods

Nematode strains, culture conditions

C. elegans strains were cultured and maintained using standard procedures²⁹. Transgenic worms expressing sGFP::MEI-2^R transgenes under the control of *mei-2* promoter and terminator were generated by MosSCI (Mos1-mediated single-copy gene insertion) using the strain EG6699 [ttTi5605 II; *unc-119* (ed3) III; *ox|Ex1578*]³⁰. Correct insertion of the transgene into chromosome II was verified by PCR. New *C. elegans* strains and plasmids used in this study are listed and detailed in **Table I** and **Table II**, respectively.

RNAi experiments

RNAi induced by feeding worm bacteria was used to deplete *mei-2* mRNA in *C. elegans* strains expressing sGFP::MEI-2^{re-coded}, resistant to *mei-2*(RNAi). 2mM IPTG were added to the saturating culture of HT115 bacteria transformed with L4440 plasmid expressing *control* (*empty vector*) or *mei-2* dsRNA. Bacteria were seeded on NGM plates complemented with 2mM IPTG. L3 larvae were transferred on “seeded IPTG plates” and maintained at 23°C for 24h. After 24h of RNAi exposition, phenotypes of embryos contained in adult worms were analyzed by microscopy (DIC or fluorescence) and embryo development was evaluated by viability assay.

Embryonic viability assay

Embryonic viability assay was achieved with adult worms exposed to *mei-2*(RNAi) for 24h at 23°C. Five adults were transferred on a new plate for 5h at 23°C. Worms were removed from the plates, laid eggs were counted and plates were maintained at 23°C for 16h. 16h later, the number of hatched and dead embryos were counted to evaluate the embryonic viability score as a percentage of the initial embryo count. The graphs were generated by using GraphPad Prism 8.0.2.

Immunofluorescence and imaging

Immunofluorescence analysis was performed on adult worms exposed to *mei-2*(RNAi) for 24h at 23°C. 20 worms were dissected in 5 µL of Shelton buffer on slides previously coated with subbing-solution (0,4% gelatin, 0,04% Chromium (III) potassium sulfate dodecahydrate, 0,1% poly-L-lysine). A 24x32 mm coverslip was placed onto the drop and the slide was frozen on a block pre-cooled on dry ice. After 20 min, the coverslip was flipped, and the slide was incubated into -20°C methanol for 20 min. Slides were rehydrated in PBS twice for 5 minutes. Samples were blocked for 1h at room temperature with 100 µL of 2% BSA in PBS. Then, slides were incubated overnight at 4°C with 100 µL primary antibodies in 2% BSA in PBS in a wet chamber. Goat anti-GFP antibody (polyclonal, 039600-101-215, Rockland) was used

at a dilution of 1:300. Mouse anti-tubulin antibody (monoclonal, DM1A, Sigma-Aldrich) was used at a dilution of 1:400. Affinity-purified rabbit anti-MEI-1 antibody was used at a dilution of 1:300. Slides were washed with PBS 0,05% Tween-20 and incubated with 100 μ L of secondary antibodies in 2% BSA in PBS for 45 minutes at room temperature. Donkey anti-goat, Alexa Fluor 488 (polyclonal, A-11055, Invitrogen); donkey anti-mouse, Alexa Fluor 568 (polyclonal, A-10037, Invitrogen); donkey anti-rabbit, Alexa Fluor 667 (polyclonal, A-31573, Invitrogen) secondary antibodies were used at a dilution of 1:1000. After washing with PBS, samples were mounted using Vectashield mounting medium containing DAPI between coverslip and slide. Coverslips were sealed with nail coat and slides were stored at 4°C. Fixed embryos were imaged using a spinning disk confocal X1 microscope with 63 \times objective. Captured images were processed using ImageJ and Photoshop.

Imaging of dissected embryos by DIC

Imaging of polar bodies phenotype of early embryos was performed using DIC microscope. Embryos were obtained by dissecting adult worms with needle in 5 μ L of M9 in coverslip. Then, the coverslip was placed on a 3% agarose pad pre-prepared on slide. DIC images were acquired by an AxioCam Hamamatsu ICcl camera (Hamamatsu Photonics) mounted on a Zeiss AxioImager A1 microscope equipped with a Plan Neofluar 100 \times /1.3-NA objective (Zeiss), and the acquisition system was controlled by Axiovision software (Zeiss). Captured images were processed using ImageJ and Photoshop.

Measurement of polar body perimeter

Measure of polar bodies was performed using ImageJ on DIC images of early embryos after *mei-2(RNAi)* exposition. The graphs were generated by using GraphPad Prism 8.0.2.

Imaging of whole worms

Imaging of full worms was performed using a Spinning Disk W1 microscope. Adult worms were anesthetized in 5 μ L of levamisole on a coverslip placed on a pre-prepared 3% agarose pad on a slide. Live imaging was performed at 23°C using a spinning disc confocal head (CSU-W1; Yokogawa Corporation of America) mounted on a DMI8 inverted microscope (Leica) equipped with 491- and 561-nm lasers (491-nm 150 mW; DPSS Laser 561 nm 150 mW) and a complementary metal-oxidesemiconductor (Orca-Flash 4 V2+, Hamamatsu). Acquisition parameters were controlled by MetaMorph software (Molecular Devices). In all cases, a 40 \times , HC PL APO 40 \times /1.30 Oil CS2 (Leica 506358) lens was used, and \sim 10 z-sections were collected at 0.5- μ m intervals. Captured images were processed using ImageJ and Photoshop.

Protein purification

Katanin (His-MEI-1/Strep-MEI-2 or His-GFP-MEI-1/Strep-MEI-2) were produced in BL21 bacteria transformed with plasmids available in Table II. Katanins were purified as described in ³¹ and stored in 50 mM TrisHCl pH=8, 500 mM NaCl, 5% glycerol at -80°C.

MBP-MEI-2 variants or fragments were produced in BL21 bacteria transformed with plasmids available in Table II. Briefly, protein production was induced with 0.5 mM final concentration of isopropyl thio-β-D-galactoside (IPTG) for 5h at 24°C. After centrifugation, cells were resuspended in lysis buffer containing (50 mM Tris-HCl, pH 8.0, 500 mM NaCl and 5% glycerol) and broken by sonication. The supernatant was loaded onto MBP-Trap columns (Cytiva) and after washing, the protein was eluted with 15mM maltose. The buffer was exchanged using G25 column for a storage buffer containing 50 mM TrisHCl pH=8, 200 mM NaCl, 5% glycerol. Then, proteins were frozen in liquid nitrogen and stored at -80°C before using for experiments

Taxol-stabilized microtubules

Microtubules were polymerized *in vitro* from purified porcine tubulin as previously described ¹⁵. After centrifugation at 90 000g for 10 minutes, microtubules were resuspended in 80 mM PIPES-KOH, pH 6.8, 1 mM MgCl₂, 1 mM EGTA, 10μM Taxol and kept at room temperature before use.

Microtubule cross-linking assay

In vitro cross-linking assay between stabilized microtubules and Katanin (6xHis-MEI-1•Strep-MEI-2) or MEI-2 (MBP-MEI-2) was performed at room temperature in 46,4 mM PIPES-KOH, pH=6,8, 0.580 mM MgCl₂, 0.580 mM EGTA, 16 mM TrisHCl, pH8, 160 mM NaCl, 1,6% glycerol, 7,8 μM taxol-stabilized microtubules and 3,52 μM Katanin. Cross-linking reaction was initiated by adding 5mM EDC (1-éthyl-3-[3-diméthylaminopropyl]carbodiimide hydrochloride). After 15 min, the reaction was stopped by adding Lammeli and was boiled at 95°C. Cross-linked complexes between bound proteins were identified and analyzed by running samples on SDS-PAGE gel (Stained free-BioRad gel 4-20% acrylamide) for Stain free, Coomassie blue staining or Western Blot analysis.

Western blotting and analysis

Western blot analysis were performed according to standard procedures ³². Mouse anti-MBP antibody (monoclonal, E8032S, NEB) was used at the dilution of 1:5000 and rabbit anti-alpha tubulin (polyclonal, Ab18251, Abcam) was used at the dilution of 1:1000. HRP-conjugated anti-mouse and anti-rabbit antibodies (Sigma-Aldrich) were used at 1:3,000, and the signal was detected with chemiluminescence (ECL-Millipore).

Table I :

Transgenic strains	Genotypes	Proteins expressed	References
wLP 903	Is[Pmei-2::sgfp::mei-2 WT recoded + unc-119(+)]II ; unc-113(ed3) III	sGFP::MEI-2 ^B WT	this study
wLP 980	Is[Pmei-2::sgfp::mei-2 K77A K78A recoded + unc-119(+)]II ; unc-113(ed3) III	sGFP::MEI-2 ^B K77A K78A	this study
wLP 1045	Is[Pmei-2::sgfp::mei-2 K77D K78D recoded + unc-119(+)]II ; unc-113(ed3) III	sGFP::MEI-2 ^B K77D K78D	this study
wLP 1047	Is[Pmei-2::sgfp::mei-2 K274A K275A recoded + unc-119(+)]II ; unc-113(ed3) III	sGFP::MEI-2 ^B K274A K275A	this study
wLP 1050	Is[Pmei-2::sgfp::mei-2 K274D K275D recoded + unc-119(+)]II ; unc-113(ed3) III	sGFP::MEI-2 ^B K274D K275D	this study
wLP 1067	Is[Pmei-2::sgfp::mei-2 K77A K78A K274A K275A recoded + unc-119(+)]II ; unc-113(ed3) III	sGFP::MEI-2 ^B K77A K78A K274A K275A	this study
wLP 982	Is[Pmei-2::sgfp::mei-2 K77D K78D K274D K275D recoded + unc-119(+)]II ; unc-113(ed3) III	sGFP::MEI-2 ^B K77D K78D K274D K275D	this study
wLP 1127	Is[Pmei-2::sgfp::mei-2 K8A K9A K77A K78A K274A K275A recoded + unc-119(+)]II ; unc-113(ed3) III	sGFP::MEI-2 ^B K8A K9A K77A K78A K274A K275A	this study
wLP 1130	Is[Pmei-2::sgfp::mei-2 K8D K9D K77D K78D K274D K275D recoded + unc-119(+)]II ; unc-113(ed3) III	sGFP::MEI-2 ^B K8D K9D K77D K78D K274D K275D	this study
wLP 1087	Is[Pmei-2::sgfp::mei-2 K246A K249A recoded + unc-119(+)]II ; unc-113(ed3) III	sGFP::MEI-2 ^B K246A K249A	this study
wLP 1092	Is[Pmei-2::sgfp::mei-2 K246D K249D recoded + unc-119(+)]II ; unc-113(ed3) III	sGFP::MEI-2 ^B K246D K249D	this study

Table II :

Plasmid	Backbone	Proteins	Insert	Tag	Reference
pNJ 795	pRSFDuet1	His-Thro-MEI-1 / Strep-Thro-MEI-2	mei-1, mei-2	6xHis, Strep	Joly et al. 2016
pNJ 534	pRSFDuet1	His-Thro-MEI-1 / Strep-Thro-MEI-2 1-153	mei-1, mei-2 1-153	6xHis, Strep	This study
pNJ 1996	pRSFDuet1	His-Thro-MEI-1 / Strep2-Thro-MEI-2 K8A K9A K77A K78A K274A K275A	mei-1, mei-2 K8A K9A K77A K78A K274A K275A	6xHis, Strep	This study
pNJ 1997	pRSFDuet1	His-Thro-MEI-1 / Strep2-Thro-MEI-2 K8D K9D K77D K78D K274D K275D	mei-1, mei-2 K8D K9D K77D K78D K274D K275D	6xHis, Strep	This study
pNJ 420	pET28b(+)	His-Thro-MEI-1	mei-1	6xHis	Joly et al. 2016
pNJ 545	pRSFDuet1	His-eGFP-MEI-1	mei-1	6xHis-eGFP	This study
pNJ 546	pRSFDuet1	His-eGFP-MEI-1 / Strep2-Thro-MEI-2	mei-1, mei-2	6xHis-eGFP, Strep	This study
pNJ 1437	pET28b(+)	MBP stop		MBP	This study
pNJ 1313	pET28b(+)	MBP-MEI-2	mei-2	MBP	This study
pNJ 1435	pET28b(+)	MBP-MEI-2 1-70	mei-2 1-70	MBP	This study
pNJ 1993	pET28b(+)	MBP-MEI-2 1-70 K8A K9A	mei-2 1-70 K8A K9A	MBP	This study
pNJ 1849	pET28b(+)	MBP-MEI-2 1-70 K8D K9D	mei-2 1-70 K8D K9D	MBP	This study
pNJ 1404	pET28b(+)	MBP-MEI-2 1-90	mei-2 1-90	MBP	This study
pNJ 1990	pET28b(+)	MBP-MEI-2 1-90 K8A K9A	mei-2 1-90 K8A K9A	MBP	This study
pNJ 1846	pET28b(+)	MBP-MEI-2 1-90 K8D K9D	mei-2 1-90 K8D K9D	MBP	This study
pNJ 1991	pET28b(+)	MBP-MEI-2 1-90 K77A K78A	mei-2 1-90 K77A K78A	MBP	This study
pNJ 1847	pET28b(+)	MBP-MEI-2 1-90 K77D K78D	mei-2 1-90 K77D K78D	MBP	This study
pNJ 1992	pET28b(+)	MBP-MEI-2 1-90 K8A K9A K77A K78A	mei-2 1-90 K8A K9A K77A K78A	MBP	This study
pNJ 1848	pET28b(+)	MBP-MEI-2 1-90 K8D K9D K77D K78D	mei-2 1-90 K8D K9D K77D K78D	MBP	This study
pNJ 1532	pET28b(+)	MBP-MEI-2 70-240	mei-2 70-240	MBP	This study
pNJ 1530	pET28b(+)	MBP-MEI-2 241-280	mei-2 241-280	MBP	This study
pNJ 1539	pET28b(+)	MBP-MEI-2 241-280 K274A K275A	mei-2 241-280 K274A K275A	MBP	This study
pNJ 1601	pET28b(+)	MBP-MEI-2 241-280 K274D K275D	mei-2 241-280 K274D K275D	MBP	This study
pNJ 1533	pET28b(+)	MBP-MEI-2 K77A K78A	mei-2 K77A K78A	MBP	This study
pNJ 1534	pET28b(+)	MBP-MEI-2 K77D K78D	mei-2 K77D K78D	MBP	This study
pNJ 1535	pET28b(+)	MBP-MEI-2 K274A K275A	mei-2 K274A K275A	MBP	This study
pNJ 1536	pET28b(+)	MBP-MEI-2 K274D K275D	mei-2 K274D K275D	MBP	This study
pNJ 1537	pET28b(+)	MBP-MEI-2 K77A K78A K274A K275A	mei-2 K77A K78A K274A K275A	MBP	This study
pNJ 1538	pET28b(+)	MBP-MEI-2 K77D K78D K274D K275D	mei-2 K77D K78D K274D K275D	MBP	This study
pNJ 1998	pET28b(+)	MBP-MEI-2 K8A K9A K274A K275A	mei-2 1-2 K8A K9A K274A K275A	MBP	This study
pNJ 1999	pET28b(+)	MBP-MEI-2 K8D K9D K274D K275D	mei-2 1-2 K8D K9D K274D K275D	MBP	This study
pNJ 1606	pET28b(+)	MBP-MEI-2 K8A K9A K77A K78A K274A K275A	mei-2 K8A K9A K77A K78A K274A K275A	MBP	This study
pNJ 1607	pET28b(+)	MBP-MEI-2 K8D K9D K77D K78D K274D K275D	mei-2 K8D K9D K77D K78D K274D K275D	MBP	This study

Figures

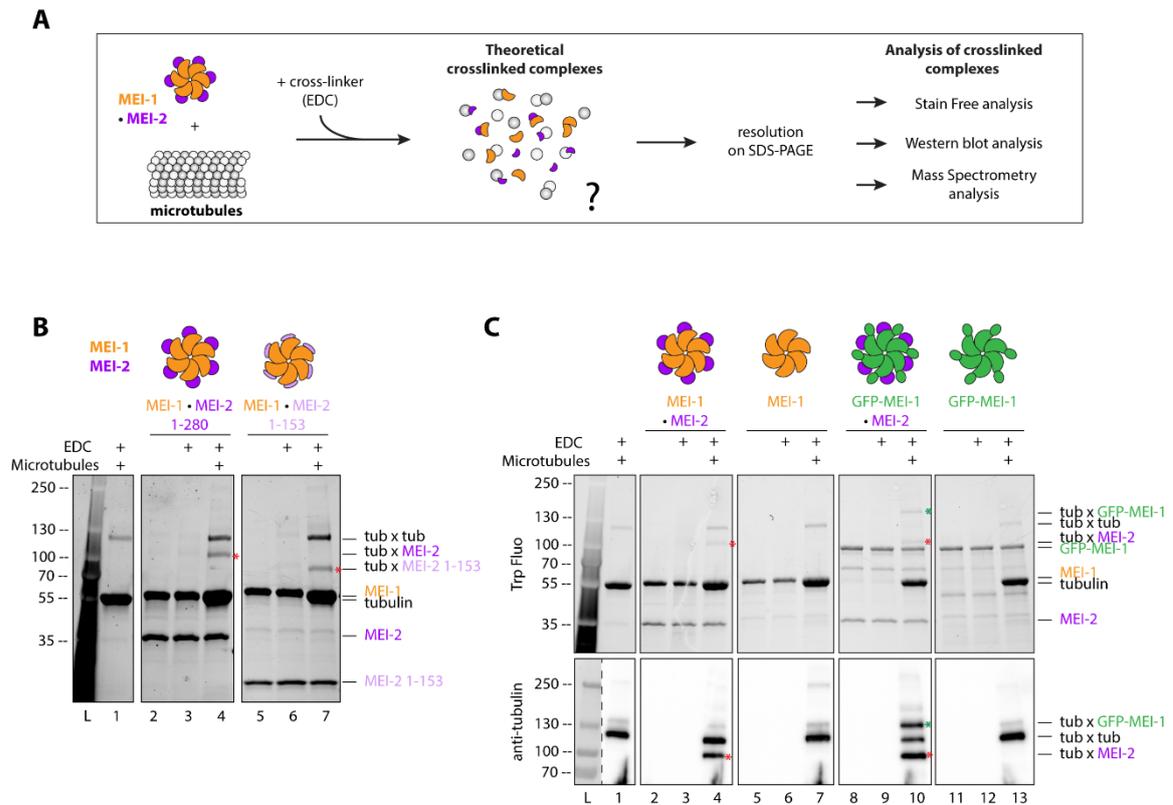


Figure 1: Both Katanin subunits interact with microtubules. A. Schematic of the *in vitro* cross-link assay, briefly purified proteins (Katanin^{MEI-1-MEI-2} and microtubules) were mixed and incubated with EDC chemical cross-linker for 15min. Samples were resolved on SDS PAGE and analyzed using Stain-free (BioRad) based on tryptophan fluorescence labeling, Western blot, or mass spectrometry. **B.** Cross-link assay between Katanin, composed of MEI-1 (orange) and MEI-2 full length (1-280) (purple) or N-terminal fragment (1-153) (light purple) and microtubules. Red stars indicate cross-linked complexes MEI-2*tubulin. SDS PAGE (BioRad) was analyzed by stain-free technique based on tryptophan fluorescence (Stain Free; Bio-Rad). **C.** Cross-link assay between Katanin^{MEI-1-MEI-2} or MEI-1 alone (orange) with or without GFP tag (green) and microtubules. Red stars indicate cross-linked complexes MEI-2*tubulin. Green star indicates cross-linked complex GFP-MEI-1*tubulin. SDS PAGE was analyzed using tryptophan fluorescence (Stain Free; Bio-Rad) (upper panel) and by Western blot using anti-tubulin antibody (lower panel).

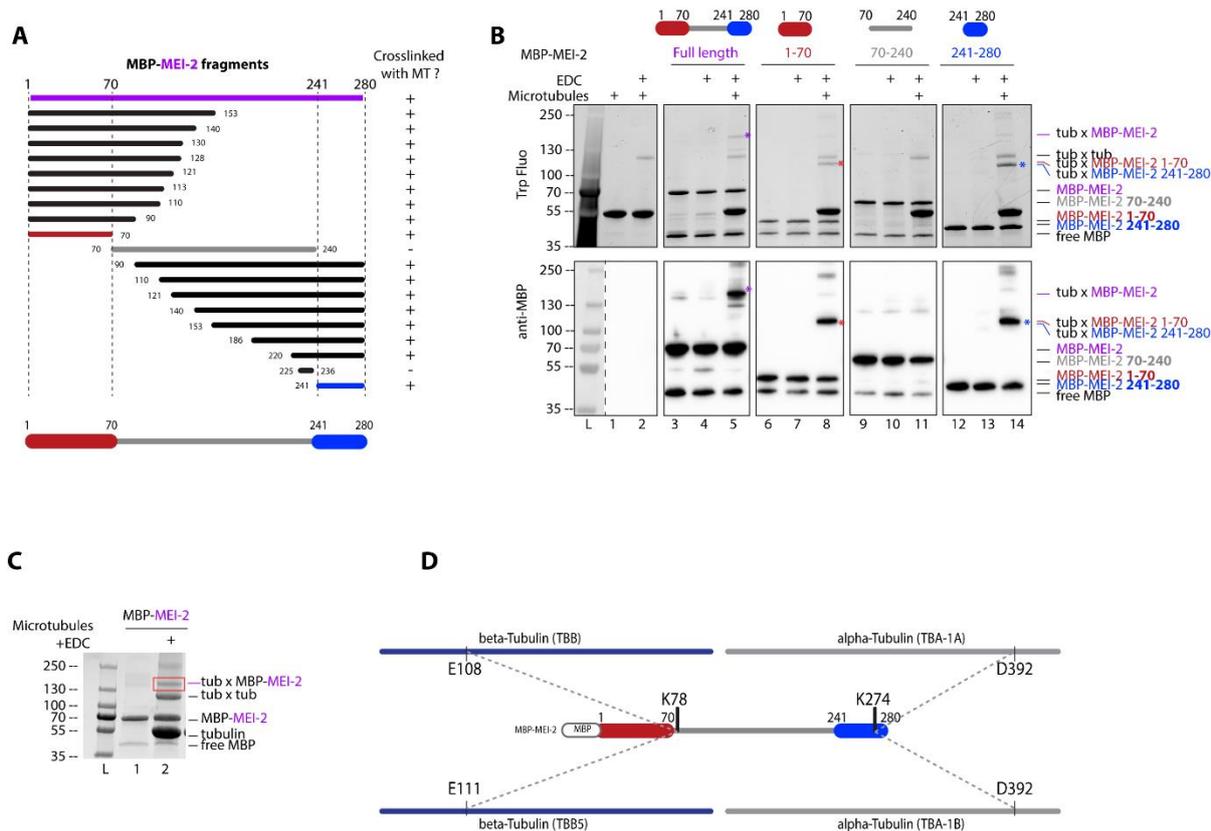


Figure 2: Katanin binds to microtubules via two domains on MEI-2 subunit. A. Schematic representation of all MEI-2 fragments tagged with MBP tested in cross-link with microtubules *in vitro*. Black fragments still cross-link with microtubules, whereas grey fragment does not. MEI-2 1-70 (red) and MEI-2 241-280 (blue) were identified as two minimal MEI-2 fragments able to cross-link with microtubules. **B.** Cross-link assay between MBP-MEI-2 full length (purple) or fragments and microtubules. Colorful stars indicate cross-linked complexes MBP-MEI-2*tubulin or MBP-MEI-2 fragment*tubulin. SDS PAGE was analyzed using tryptophan fluorescence (Stain Free; Bio-Rad; upper panel) and by Western blot using anti-MBP antibody (lower panel). The absence of cross-link between MBP tag alone and microtubules is controlled in Figure Supplementary S2. **C.** Red square corresponds to cross-link complex MBP-MEI-2*tubulin extracted from SDS PAGE to be analyzed by mass spectrometry. **D.** Schematic representation of MEI-2, alpha- and beta-tubulins cross-linked residues identified by mass-spectrometry. Two MEI-2 residues were identified as specifically cross-linked with alpha- or beta-tubulin.

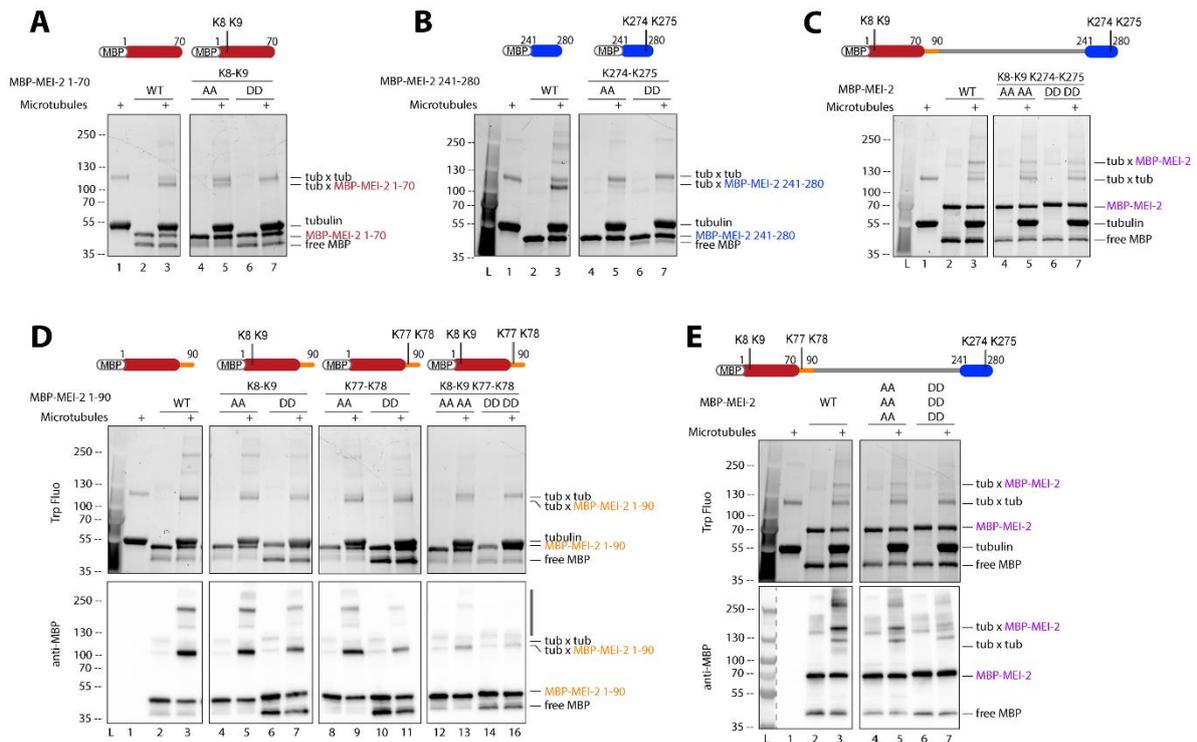


Figure 3: Microtubule binding of MEI-2 depends on Lysine patches. Cross-link assay between MBP-MEI-2 fragments and microtubules. The lysines (KK) of interested were mutated in alanines (AA) or aspartates (DD) in minimal MBP-MEI-2 fragments (A) 1-70 (red) and (B) 241-280 (blue), in MBP-MEI-2 full length (C and E) or in MBP-MEI-2 fragment (D) 1-90 (orange). SDS PAGE (BioRad) was analyzed using tryptophan fluorescence (Stain Free; Bio-Rad; upper panel) and by Western blot using anti-MBP antibody (lower panel) for D and E.

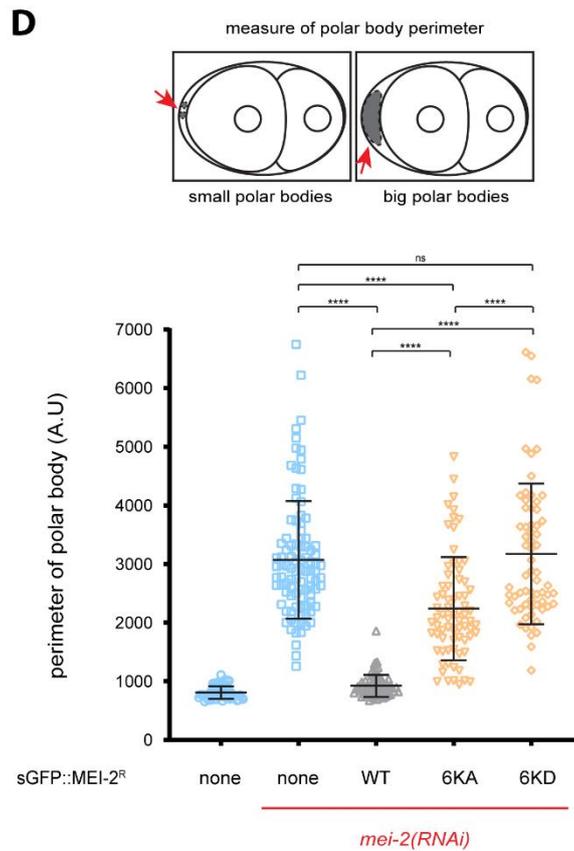
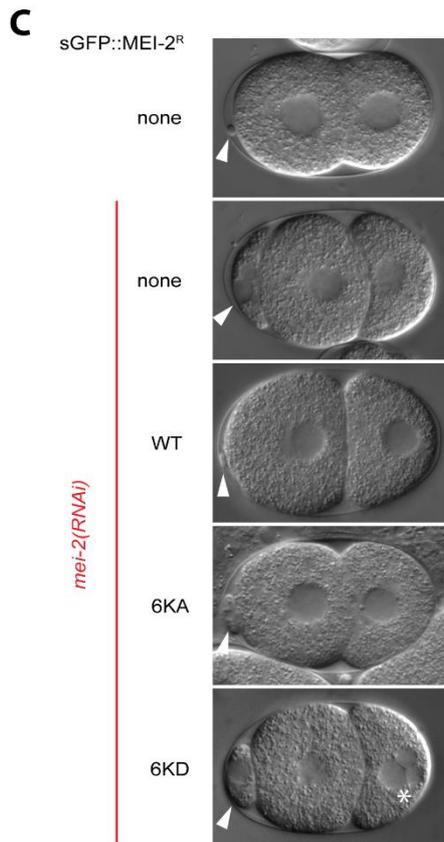
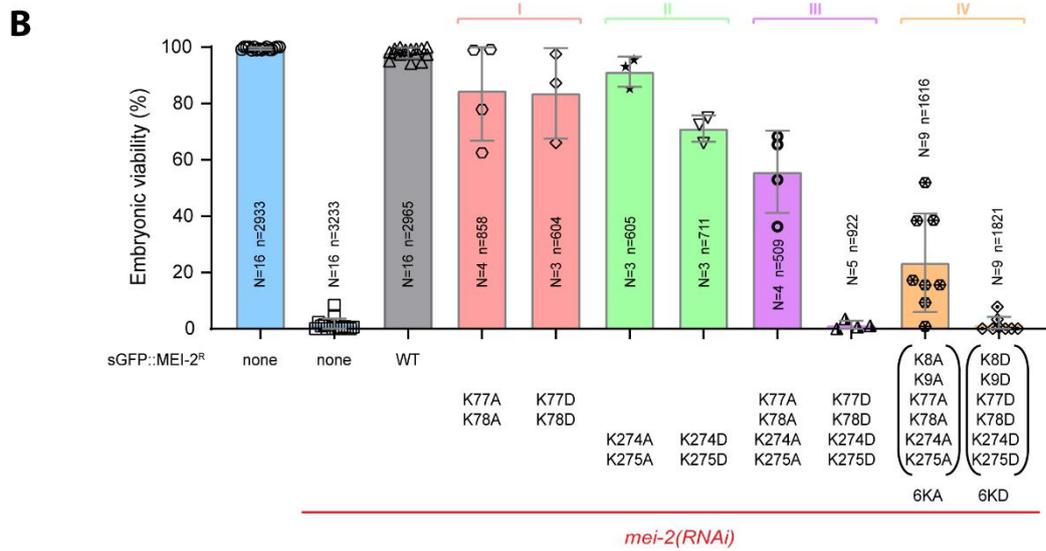
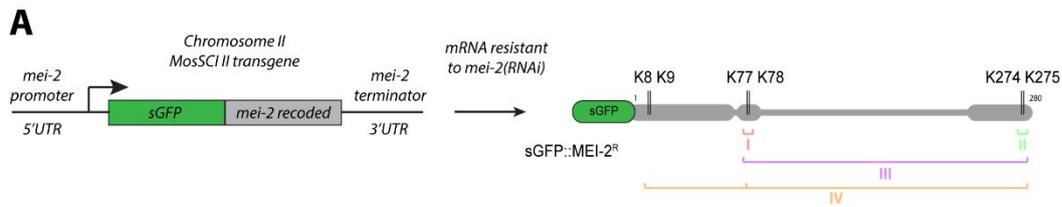


Figure 4: Charge-dependent interaction MEI-2•microtubules is required for Katanin^{MEI-1•MEI-2} activity during female meiosis. **A.** Schematic representation of MosSCI transgene expressing *sGFP::mei-2^R* (recoded) under the control of *mei-2* promoter and *mei-2* terminator. Recoding of *mei-2* allows *mei-2* mRNA resistance to *mei-2(RNAi)*. The schematics also represents *sGFP::MEI-2^R* recombinant protein expressed in worms and mutated lysines. **B.** Viability of embryos expressing *sGFP::MEI-2^R* WT and mutants exposed to *mei-2(RNAi)*. Error bars indicate SEM. **C.** DIC images of two-cells stage embryos expressing *sGFP::MEI-2^R* WT, 6KA and 6KD mutants exposed to *mei-2(RNAi)*. White arrows indicate polar bodies and white asterisk indicates multi-nuclei. **D** Measure of polar bodies perimeter of early embryos expressing *sGFP::MEI-2^R* WT, 6KA and 6KD mutants exposed to *mei-2(RNAi)*. Error bars indicate SEM.

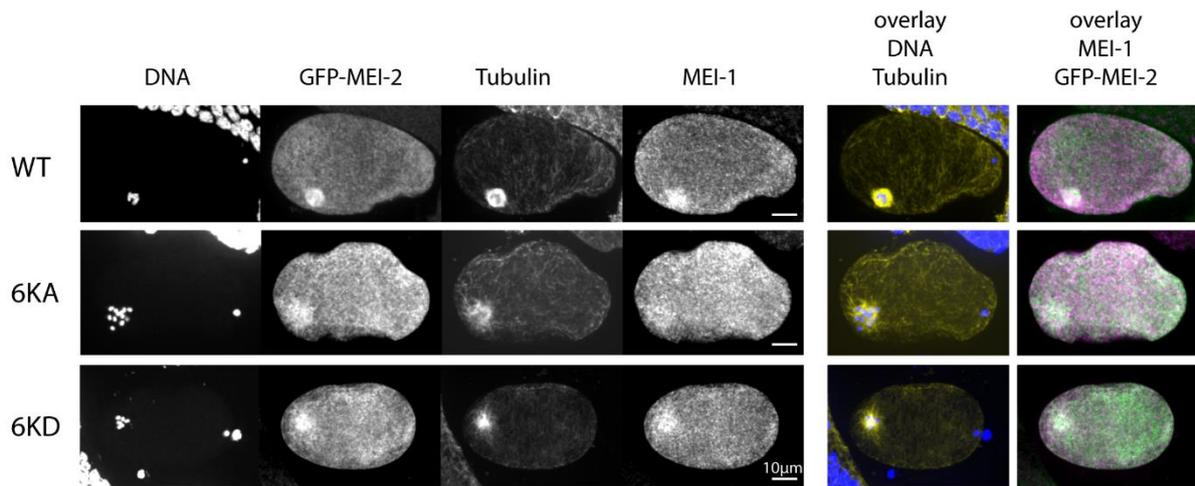


Figure 5: Lack of microtubule-binding does not affect Katanin^{MEI-1•MEI-2} localization during female meiosis

Representative spinning disk images of fixed meiotic embryos expressing sGFP::MEI-2^R WT, 6KA and 6KD mutants exposed to *mei-2(RNAi)*. Embryos were immuno-stained with anti-GFP (green), anti-tubulin (yellow), anti-MEI-1 (magenta) antibodies and colored with DAPI (blue).

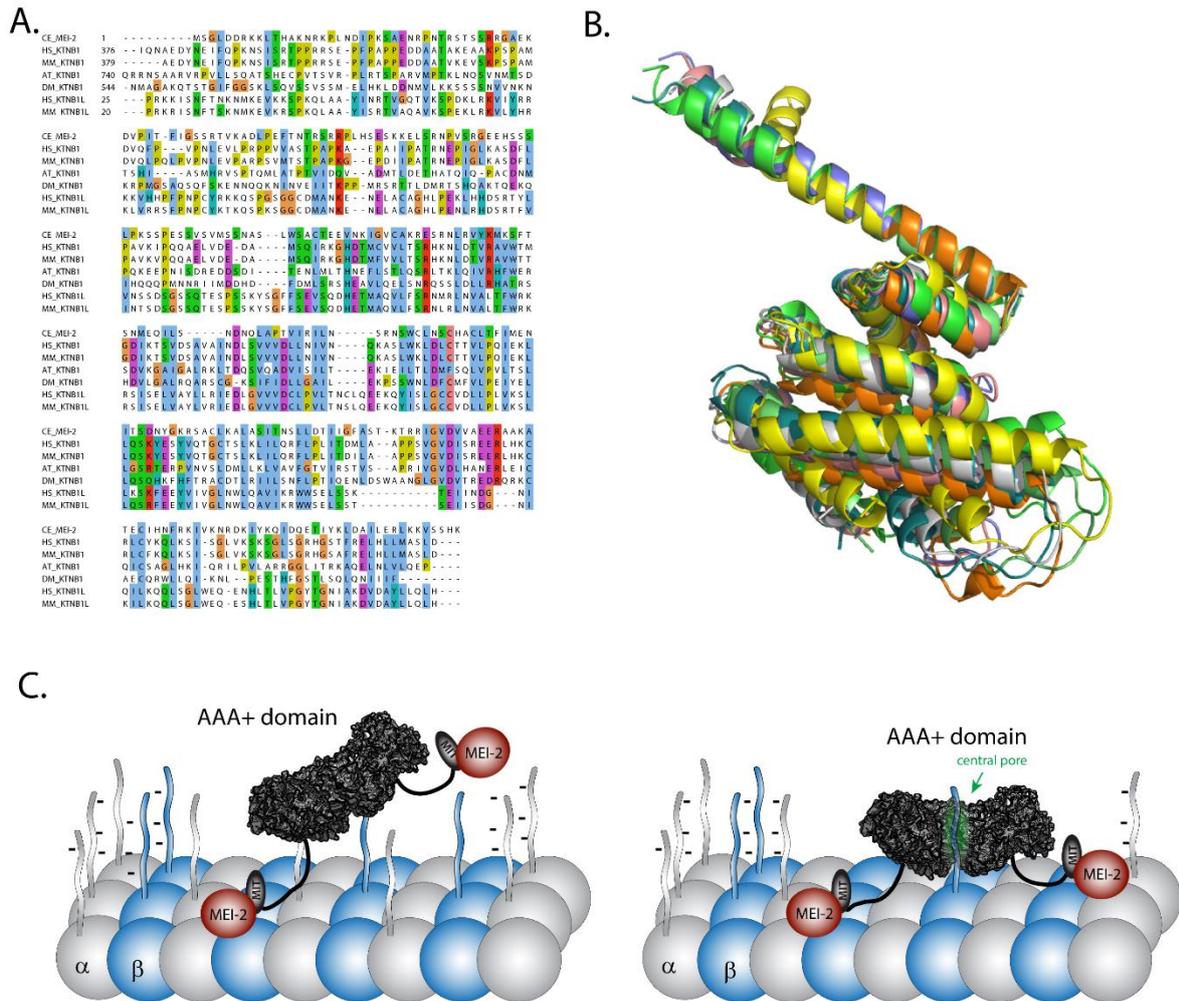


Figure 6:

A. Protein sequences alignment of p80 and p80-like Katanin subunits from different species. CE: *C. elegans*; HS: *Homo sapiens*; MM: *Mus musculus*; AT: *Arabidopsis thaliana*; DM: *Drosophila melanogaster*. **B.** Structural alignment of the C-terminal part of p80 and p80-like Katanin subunits from different species. Single protein structures are presented in **Figure S4**. **C.** Working model of microtubule binding of Katanin essential for microtubule severing activity.

Supplementary figures :

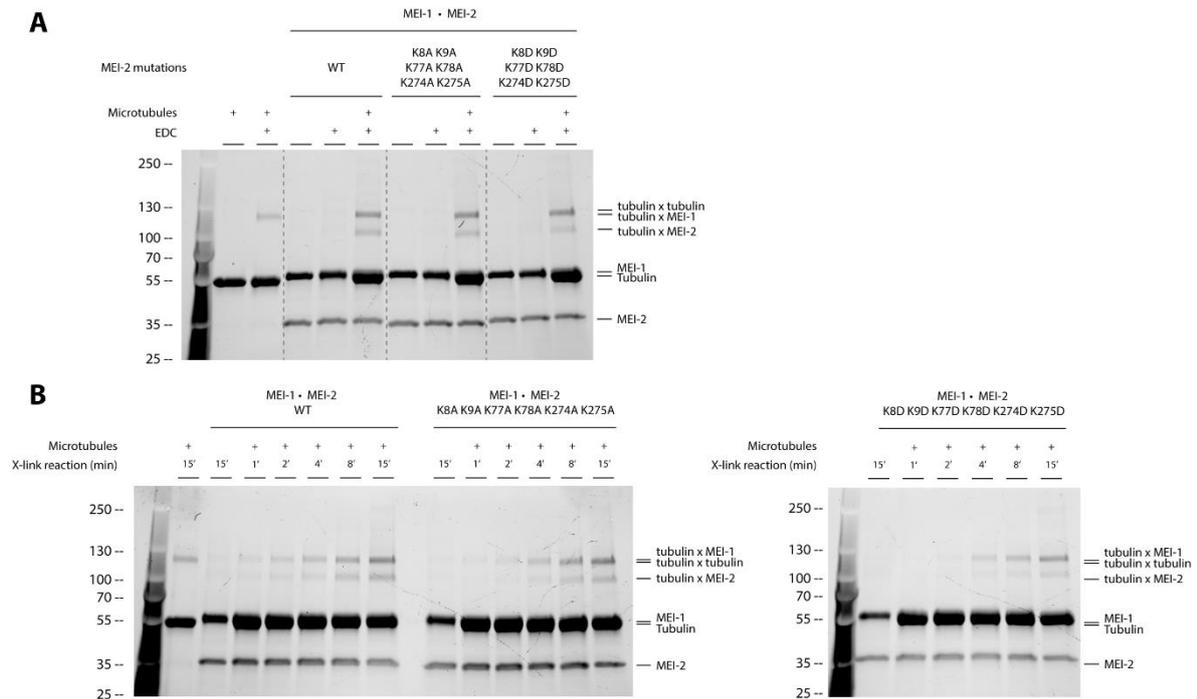


Figure S1: The Katanin^{MEI-1•MEI-2} affinity is affected by the charge of residues. A. Cross-link assay between Katanin composed of MEI-1 and MEI-2 WT, 6KA or 6KD and microtubules *in vitro*. SDS PAGE (BioRad) was analyzed by free staining based on tryptophan fluorescence. **B.** Time course of cross-link reaction between Katanin^{MEI-1•MEI-2} WT, 6KA or 6KD and microtubules showing the accumulation of cross-linked complex MEI-2•tubuline over time. SDS PAGE (BioRad) was analyzed by free staining based on tryptophan fluorescence.

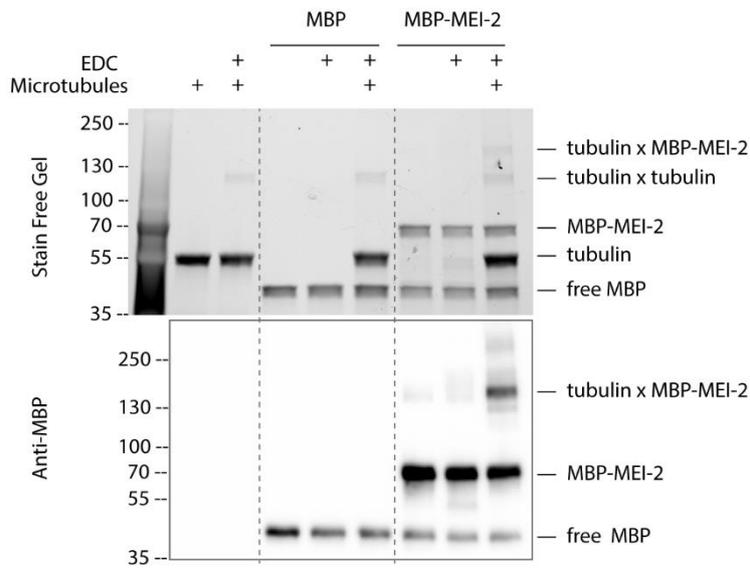


Figure S2: MEI-2 specifically cross-links with microtubules *in vitro*. Cross-link assay between MBP alone or MEI-2 fused to MBP tag and microtubules. SDS PAGE (BioRad) was analyzed by free staining based on tryptophan fluorescence (upper panel) and by Western blot using anti-MBP antibody (lower panel).

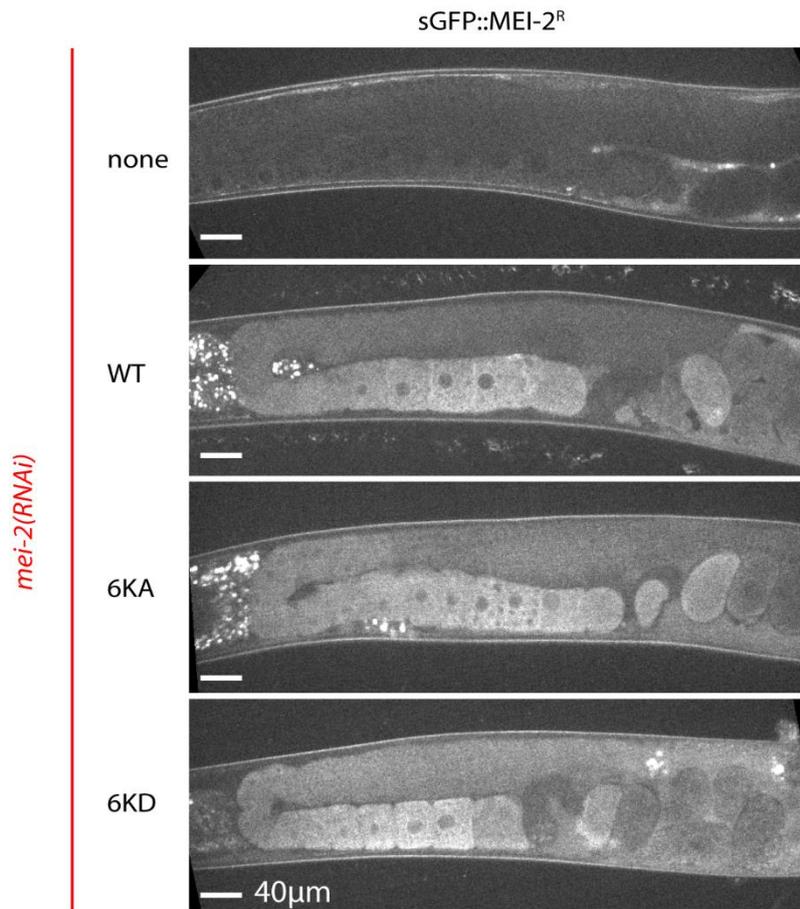


Figure S3: Control of sGFP::MEI-2^R expression in worm. Spinning disk images of adult worm expressing sGFP::MEI-2^R WT, 6KA and 6KD exposed to *mei-2(RNAi)*. sGFP fluorescence (grey) is showing that the sGFP::MEI-2^R WT, 6KA and 6KD are expressed at the similar level in the oocytes cytoplasm in gonads.

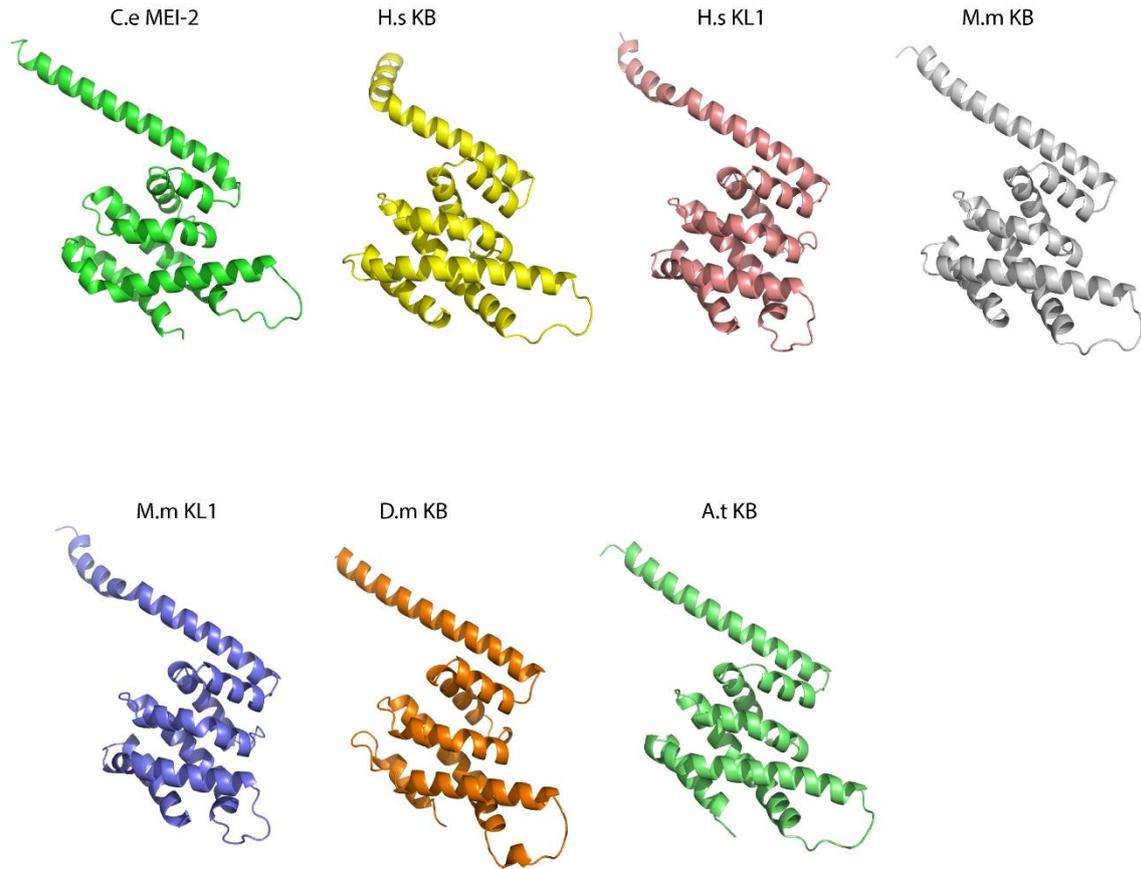


Figure S4: Conservation of structural organization of Katanin p80 subunits

Structural models of C-terminal part of p80 and p80-like subunits in different species based on protein sequences presented in **Figure 6**. Ce MEI-2: *C. elegans* MEI-2; Hs KB: *Homo sapiens* KATNB1; Hs KL1: *Homo sapiens* KATNBL1; Mm KB: *Mus musculus* KATNB1; Mm KL1: *Mus musculus* KATNBL1; Dm KB: *Drosophila melanogaster* Kat80; A.t KB: *Arabidopsis thaliana* KTN80.

References

1. Roll-Mecak, A., and McNally, F.J. (2010). Microtubule-severing enzymes. *Curr Opin Cell Biol* 22, 96-103. 10.1016/j.ceb.2009.11.001.
2. Sharp, D.J., and Ross, J.L. (2012). Microtubule-severing enzymes at the cutting edge. *J Cell Sci* 125, 2561-2569. 10.1242/jcs.101139.
3. Kuo, Y.W., and Howard, J. (2021). Cutting, Amplifying, and Aligning Microtubules with Severing Enzymes. *Trends Cell Biol* 31, 50-61. 10.1016/j.tcb.2020.10.004.
4. Lynn, N.A., Martinez, E., Nguyen, H., and Torres, J.Z. (2021). The Mammalian Family of Katanin Microtubule-Severing Enzymes. *Front Cell Dev Biol* 9, 692040. 10.3389/fcell.2021.692040.
5. McNally, F.J., and Roll-Mecak, A. (2018). Microtubule-severing enzymes: From cellular functions to molecular mechanism. *J Cell Biol* 217, 4057-4069. 10.1083/jcb.201612104.
6. Sarbanes, S.L., Zehr, E.A., and Roll-Mecak, A. (2022). Microtubule-severing enzymes. *Curr Biol* 32, R992-R997. 10.1016/j.cub.2022.08.046.
7. Vemu, A., Szczesna, E., Zehr, E.A., Spector, J.O., Grigorieff, N., Deaconescu, A.M., and Roll-Mecak, A. (2018). Severing enzymes amplify microtubule arrays through lattice GTP-tubulin incorporation. *Science* 361. 10.1126/science.aau1504.
8. Kuo, Y.W., Trottier, O., Mahamdeh, M., and Howard, J. (2019). Spastin is a dual-function enzyme that severs microtubules and promotes their regrowth to increase the number and mass of microtubules. *Proc Natl Acad Sci U S A* 116, 5533-5541. 10.1073/pnas.1818824116.
9. White, S.R., Evans, K.J., Lary, J., Cole, J.L., and Luring, B. (2007). Recognition of C-terminal amino acids in tubulin by pore loops in Spastin is important for microtubule severing. *J Cell Biol* 176, 995-1005. 10.1083/jcb.200610072.
10. Hartman, J.J., Mahr, J., McNally, K., Okawa, K., Iwamatsu, A., Thomas, S., Cheesman, S., Heuser, J., Vale, R.D., and McNally, F.J. (1998). Katanin, a microtubule-severing protein, is a novel AAA ATPase that targets to the centrosome using a WD40-containing subunit. *Cell* 93, 277-287.
11. McNally, K.P., Bazirgan, O.A., and McNally, F.J. (2000). Two domains of p80 katanin regulate microtubule severing and spindle pole targeting by p60 katanin. *J Cell Sci* 113 (Pt 9), 1623-1633.
12. Mishra-Gorur, K., Caglayan, A.O., Schaffer, A.E., Chabu, C., Henegariu, O., Vonhoff, F., Akgumus, G.T., Nishimura, S., Han, W., Tu, S., et al. (2014). Mutations in KATNB1 cause complex cerebral malformations by disrupting asymmetrically dividing neural progenitors. *Neuron* 84, 1226-1239. 10.1016/j.neuron.2014.12.014.
13. McNally, F.J., and Vale, R.D. (1993). Identification of katanin, an ATPase that severs and disassembles stable microtubules. *Cell* 75, 419-429.
14. Zehr, E.A., Szyk, A., Szczesna, E., and Roll-Mecak, A. (2019). Katanin Grips the beta-Tubulin Tail through an Electropositive Double Spiral to Sever Microtubules. *Dev Cell*. 10.1016/j.devcel.2019.10.010.
15. Joly, N., Martino, L., Gigant, E., Dumont, J., and Pintard, L. (2016). Microtubule-severing activity of the AAA+ ATPase Katanin is essential for female meiotic spindle assembly. *Development* 143, 3604-3614. 10.1242/dev.140830.
16. Hu, W.F., Pomp, O., Ben-Omran, T., Kodani, A., Henke, K., Mochida, G.H., Yu, T.W., Woodworth, M.B., Bonnard, C., Raj, G.S., et al. (2014). Katanin p80 regulates human cortical development by limiting centriole and cilia number. *Neuron* 84, 1240-1257. 10.1016/j.neuron.2014.12.017.
17. Srayko, M., Buster, D.W., Bazirgan, O.A., McNally, F.J., and Mains, P.E. (2000). MEI-1/MEI-2 katanin-like microtubule severing activity is required for *Caenorhabditis elegans* meiosis. *Genes Dev* 14, 1072-1084.
18. Schapira, M., Tyers, M., Torrent, M., and Arrowsmith, C.H. (2017). WD40 repeat domain proteins: a novel target class? *Nat Rev Drug Discov* 16, 773-786. 10.1038/nrd.2017.179.

19. Mains, P.E., Kempfues, K.J., Sprunger, S.A., Sulston, I.A., and Wood, W.B. (1990). Mutations affecting the meiotic and mitotic divisions of the early *Caenorhabditis elegans* embryo. *Genetics* *126*, 593-605.
20. McNally, K., Audhya, A., Oegema, K., and McNally, F.J. (2006). Katanin controls mitotic and meiotic spindle length. *J Cell Biol* *175*, 881-891.
21. Srayko, M., O'Toole E, T., Hyman, A.A., and Muller-Reichert, T. (2006). Katanin disrupts the microtubule lattice and increases polymer number in *C. elegans* meiosis. *Curr Biol* *16*, 1944-1949, 2006. S0960-9822(06)02041-0 [pii]10.1016/j.cub.2006.08.029.
22. Clark-Maguire, S., and Mains, P.E. (1994). Localization of the mei-1 gene product of *Caenorhabditis elegans*, a meiotic-specific spindle component. *J Cell Biol* *126*, 199-209.
23. Clark-Maguire, S., and Mains, P.E. (1994). mei-1, a gene required for meiotic spindle formation in *Caenorhabditis elegans*, is a member of a family of ATPases. *Genetics* *136*, 533-546.
24. Clandinin, T.R., and Mains, P.E. (1993). Genetic studies of mei-1 gene activity during the transition from meiosis to mitosis in *Caenorhabditis elegans*. *Genetics* *134*, 199-210.
25. Gomes, J.E., Tavernier, N., Richaudeau, B., Formstecher, E., Boulin, T., Mains, P.E., Dumont, J., and Pintard, L. (2013). Microtubule severing by the katanin complex is activated by PPFR-1-dependent MEI-1 dephosphorylation. *J Cell Biol* *202*, 431-439, 2013. jcb.201304174 [pii]10.1083/jcb.201304174.
26. Han, X., Gomes, J.E., Birmingham, C.L., Pintard, L., Sugimoto, A., and Mains, P.E. (2009). The Role of Protein Phosphatase 4 in Regulating Microtubule Severing in the *Caenorhabditis elegans* Embryo. *Genetics* *181*, 933-943.
27. McNally, K., Berg, E., Cortes, D.B., Hernandez, V., Mains, P.E., and McNally, F.J. (2014). Katanin maintains meiotic metaphase chromosome alignment and spindle structure in vivo and has multiple effects on microtubules in vitro. *Mol Biol Cell* *25*, 1037-1049, 2014. mbc.E13-12-0764 [pii]10.1091/mbc.E13-12-0764.
28. Lu, C., Srayko, M., and Mains, P.E. (2004). The *Caenorhabditis elegans* Microtubule-severing Complex MEI-1/MEI-2 Katanin Interacts Differently with Two Superficially Redundant β -Tubulin Isoforms. *Molecular Biology of the Cell* *15*, 142-150.
29. Brenner, S. (1974). The genetics of *Caenorhabditis elegans*. *Genetics* *77*, 71-94, 1974.
30. Frokjaer-Jensen, C., Davis, M.W., Hopkins, C.E., Newman, B.J., Thummel, J.M., Olesen, S.P., Grunnet, M., and Jorgensen, E.M. (2008). Single-copy insertion of transgenes in *Caenorhabditis elegans*. *Nat Genet* *40*, 1375-1383, 2008. ng.248 [pii]10.1038/ng.248.
31. Joly, N., Beaumale, E., Van Hove, L., Martino, L., and Pintard, L. (2020). Phosphorylation of the microtubule-severing AAA+ enzyme Katanin regulates *C. elegans* embryo development. *J Cell Biol* *219*. 10.1083/jcb.201912037.
32. Sambrook, J., Fritsch, E.F., and Maniatis, T. (1989). *Molecular Cloning. A Laboratory Manual* (2nd ed.) Cold Spring Harbor Laboratory Press, Cold Spring Harbor, NY

Discussion et Perspectives

Mon travail de thèse a permis de mettre en évidence de nouveaux modes de régulation de l'activité de la Katanine chez *C. elegans*. La Katanine est une enzyme composée de deux sous-unités, une catalytique (p60) et une régulatrice (p80), qui disposent chacune de fonctions qui leur sont propres. Il est crucial que ces deux sous-unités se coordonnent pour assurer la reconnaissance spécifique et la coupure des microtubules. Cette activité requiert que les sous-unités soient organisées et assemblées sous forme d'un hexamère de dimères, que cet hexamère interagisse à la surface du microtubule puis avec une queue carboxy-terminale d'une tubuline via le pore central, et enfin qu'il soit en mesure d'hydrolyser l'ATP et d'extraire cette tubuline du microtubule.

Chez *C. elegans*, notre modèle d'étude, l'activité de coupure des microtubules par la Katanine^{MEI-1•MEI-2} est essentielle pour la formation des deux fuseaux méiotiques femelles. Néanmoins, si cette activité est maintenue à un niveau élevé durant la première mitose, cela entraîne des défauts de la dynamique du fuseau mitotique, ce qui est létal pour le développement embryonnaire. Au cours de cette transition méiose-mitose, il existe donc une régulation précise pour réduire l'activité de la Katanine^{MEI-1•MEI-2} en mitose. Même si la réduction de la quantité de la Katanine^{MEI-1•MEI-2} au cours de cette transition est évidente, nous avons montré que la Katanine^{MEI-1•MEI-2} subsiste durant les mitoses suivantes. Nous avons aussi montré qu'en plus de la régulation par l'envoi à la dégradation de la Katanine^{MEI-1•MEI-2}, des phosphorylations de la sous-unité catalytique inhibent son activité intrinsèque d'hydrolyse de l'ATP en réponse aux microtubules. La sous-unité régulatrice quant à elle, régule l'activité de la Katanine^{MEI-1•MEI-2} via son interaction avec les microtubules. Nous avons identifié que MEI-2 contient deux domaines d'interaction aux microtubules qui ciblent spécifiquement la tubuline α et la tubuline β du microtubule. Cette interaction spécifique est dépendante des charges des résidus impliqués et permet une modulation de l'activité de la Katanine^{MEI-1•MEI-2} au cours de la méiose chez *C. elegans* mais sans affecter la localisation de l'enzyme aussi assurée par la sous-unité régulatrice. L'ensemble de nos résultats démontrent des modes de régulation distincts de l'activité de la Katanine^{MEI-1•MEI-2} et met en évidence un rôle primordial de la sous-unité régulatrice dans l'activité des Katanines.

1. Rôle de la Katanine^{MEI-1•MEI-2} durant la mitose au cours du développement embryonnaire

Dans la littérature et ce depuis le début de la caractérisation de la Katanine^{MEI-1•MEI-2} chez *C. elegans* (à partir des études génétiques de Paul Mains, 1990), cette MSE a été décrite comme indispensable à la méiose femelle et extrêmement toxique pour la mitose. Cette observation met en évidence une voie de régulation de son activité au cours de la transition méiose-mitose essentielle au développement embryonnaire. Nous avons montré pour la première fois, que même s'il existe une diminution drastique de son niveau de protéines après la méiose, une fraction de Katanine^{MEI-1•MEI-2} persiste durant la première mitose et les mitoses suivantes au cours du développement embryonnaire (Joly et al., 2020). Lors des divisions mitotiques, la Katanine^{MEI-1•MEI-2} est principalement recrutée sur les centrosomes du fuseau et sur les chromosomes. Ce résultat inattendu soulève la question du rôle de la Katanine^{MEI-1•MEI-2} durant la mitose chez *C. elegans*. Cette observation est consistante avec l'analyse du niveau d'expression d'ARNm de *mei-1* qui perdure dans les embryons plusieurs heures après la méiose suggérant fortement que *mei-1* continue de s'exprimer au cours du développement embryonnaire (Clark-Maguire and Mains, 1994a). De même, il a été montré que l'activité de MEL-26 est requise pendant le développement embryonnaire (Mains et al., 1990a).

Dans les cellules humaines ainsi que chez la Drosophile, la Katanine est requise pour la division mitotique (Lynn et al., 2021). Les sous-unités de la Katanine sont présentes sur le fuseau et en particulier sur les centrosomes. Elles participent activement au maintien de la structure et de la taille du fuseau (Lynn et al., 2021). Par exemple, la Katanine active aux centrosomes permet un recrutement de la γ -tubuline essentielle à la nucléation des microtubules à partir des centrosomes (Buster et al., 2002; Lynn et al., 2021).

Afin de caractériser le rôle de la Katanine^{MEI-1•MEI-2} en mitose, il serait possible d'utiliser une souche de vers thermosensibles exprimant une mutation de *mei-1(ts)* (O'Rourke et al., 2011). Cette mutation affecte l'activité de la Katanine^{MEI-1•MEI-2} lors d'une exposition des vers à une température non permissive, soit 23°C. De façon expérimentale, nous pourrions suivre par microscopie (DIC) le développement d'un embryon disséqué dès la méiose à une température permissive, soit environ 16°C. Ainsi, l'activité de la Katanine serait suffisante pour participer à l'assemblage des deux fuseaux méiotiques fonctionnels. Une fois la méiose terminée, nous pourrions changer la température à 23°C pour exprimer la mutation de *mei-1* affectant l'activité de la Katanine^{MEI-1•MEI-2} durant la mitose et analyser les conséquences de cette mutation sur la dynamique du fuseau mitotique au cours du développement embryonnaire.

2. Modulation de l'affinité de la Katanine^{MEI-1•MEI-2} pour les microtubules par les phosphorylations de MEI-2

Nous avons montré que les phosphorylations de MEI-1 par la kinase MKB-2 inhibent la stimulation de l'activité ATPase de la Katanine^{MEI-1•MEI-2} en présence de microtubules à la transition méiose-mitose chez *C. elegans* (Joly et al., 2020). La sous-unité régulatrice MEI-2 étant aussi phosphorylée par MBK-2, il serait intéressant d'étudier les effets de ces phosphorylations spécifiques sur la régulation de l'activité de la Katanine^{MEI-1•MEI-2}. Les résidus de MEI-2 phosphorylés par MBK-2 sont T32, S68, et S86 (**Figure 23**). Ces sites sont localisés dans le MTBD1 que nous avons identifié dans notre seconde étude comme une région prédite pour être non structurée (**Figure 18**). Il a aussi été rapporté chez d'autres MAPs, que les phosphorylations de MAP4 sur son domaine d'interaction aux microtubules, ou celles de PRC1 et Hec1 sur un domaine non structuré, modifient leur affinité pour les microtubules (Ramkumar et al., 2017; Walczak and Shaw, 2010). Il a aussi été décrit que la dépolymérase MCAK qui est phosphorylée par Aurora A, voit son affinité pour les microtubules réduite par les phosphorylations (McHugh et al., 2019).

Les phosphorylations de MEI-2 par MBK-2 sont-elles capables de moduler l'affinité de la Katanine^{MEI-1•MEI-2} pour les microtubules ? Pour le tester, nous pourrions purifier à partir de bactéries de la Katanine^{MEI-1•MEI-2} phosphorylée sur les résidus d'intérêt de MEI-2, comme cela a été fait dans notre étude (Joly et al., 2020). Ainsi, nous pourrions tester l'affinité de la Katanine^{MEI-1•MEI-2} phosphorylée pour les microtubules *in vitro*. Des mutants phosphomimétiques (aspartate) pourraient aussi être exprimés *in vivo* chez *C. elegans* pour caractériser leurs effets sur l'activité de la Katanine^{MEI-1•MEI-2} au cours de la méiose. Ce mécanisme de régulation serait un moyen efficace pour réduire rapidement l'activité du complexe Katanine^{MEI-1•MEI-2} (i) en bloquant l'accès au substrat via MEI-2 et (ii) en inhibant l'activité ATPase de MEI-1.

3. Rôle fondamental de la sous-unité régulatrice dans l'interaction productive de la Katanine avec les microtubules

L'activité de coupure des microtubules par la Katanine nécessite la présence et la coopération de ses deux sous-unités. Nous avons démontré que la sous-unité régulatrice MEI-2 est indispensable pour l'interaction de la sous-unité catalytique MEI-1 avec les microtubules. Il a été aussi démontré que la Katanine^{MEI-1•MEI-2} est en mesure d'interagir avec la queue carboxy-terminale de la tubuline via le pore central de MEI-1 en présence de MEI-2 (Zehr et al., 2020). MEI-2 agit ainsi comme un adaptateur du complexe enzymatique sur la surface du microtubule.

Nous avons montré que MEI-2 interagit avec les microtubules via deux domaines MTBDs. Chacun de ces MTBDs cible spécifiquement la tubuline α et la tubuline β du microtubule. D'après nos résultats de pontage chimique entre MEI-2 et les microtubules, MEI-2 n'interagit qu'avec une seule tubuline à la fois. En remplaçant les résidus des tubulines impliqués dans cette interaction sur la structure du microtubule, nous avons pu observer qu'ils sont localisés à la surface de celui-ci (**Figure 22**). L'ensemble de ces observations suggère que le complexe Katanine^{MEI-1•MEI-2} adopte une position spécifique à la surface du microtubule via les deux interactions de MEI-2 avec les tubulines.

De plus, d'après les données de la littérature, il a été rapporté que la queue carboxy-terminale de la tubuline β est favorisée par rapport à celle de la tubuline α (même si la tubuline α est aussi impliquée) pour son interaction dans le pore central et l'activité de la Katanine (Bailey et al., 2015; Johjima et al., 2015; Valenstein and Roll-Mecak, 2016; Zehr et al., 2020). Aussi, la mutation E439K de la tubuline β identifiée chez *C. elegans tbb-2(sb26)* qui supprime le phénotype du gain de fonction, conduit à une réduction de la toxicité de la Katanine^{MEI-1•MEI-2} en mitose (Lu and Mains, 2005; Lu et al., 2004). La mutation est aussi localisée sur la queue carboxy-terminale de la tubuline.

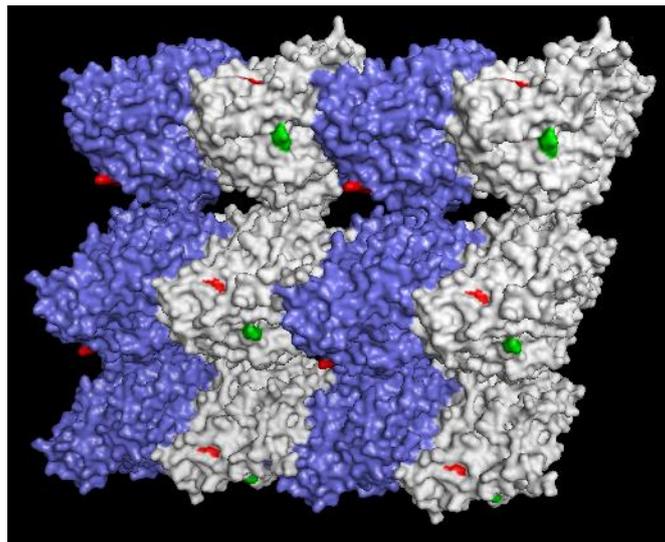


Figure 22 : Exposition à la surface externe du microtubule des résidus de la tubuline impliqués dans l'interaction Katanine^{MEI-1•MEI-2}-microtubule. Structure par cryo-microscopie électronique d'un microtubule assemblé à partir de tubuline-GDP de porc (PDB ID : 6ew0). La tubuline α est colorée en gris et la tubuline β en bleu. Les sites D392 de la tubuline α et E111 de la tubuline β identifiés par cross-link en interaction avec MEI-2 sont colorés en rouge. La mutation E194K de la tubuline α identifié chez *C. elegans tba(sb27)* comme suppresseur du *gain de fonction* est colorée en vert.

Le mécanisme de coupure des microtubules par la Katanine que nous proposons est le suivant : la Katanine^{p60•p80} est composée des sous-unités p60 et p80. La sous-unité p80 stabilise le complexe p60:p80 sous forme d'hexamère de dimère p60:p80, et permet la localisation subcellulaire du

complexe enzymatique. p80 positionne la Katanine^{p60•p80} à la surface du microtubule en interagissant directement avec le corps des tubulines α et β via ses deux domaines. Cette interaction p80•microtubule pourrait induire des changements conformationnels de la Katanine^{p60•p80} conduisant au rapprochement spatial de p60 à la surface du microtubule. Les sous-unités p60, sous forme d'hexamère interagissent directement avec une queue carboxy-terminale de la tubuline via le pore central en favorisant celle de la tubuline β . Cette interaction spécifique Katanine^{p60•p80}•microtubule en deux étapes, dépendante de la contribution de p80, pourrait entraîner une stimulation de l'activité d'hydrolyse de l'ATP qui n'est possible qu'en présence de p80. Ainsi, les boucles à l'intérieur du pore central en interaction avec la queue de la tubuline peuvent entrer en mouvement pour permettre l'extraction de la tubuline du microtubule. Les dommages ainsi causés au microtubule entraîneront une déstabilisation de celui-ci et sa cassure.

4. Conservation du mode d'interaction de la Katanine avec les microtubules entre espèces

Chez *C. elegans*, la Katanine^{MEI-1•MEI-2} interagit avec les microtubules via la sous-unité régulatrice MEI-2 via deux domaines distincts pour assurer son activité de coupure des microtubules. Nous avons montré que même si les séquences des MTBD1 et MTBD2 ne sont pas strictement conservées entre différentes espèces, l'organisation structurale de la partie C-terminale de p80 est très bien conservée. Cela suggère fortement que le mécanisme d'interaction avec les microtubules via p80 est très similaire entre différentes espèces telles que le nématode, la plante, la drosophile ou les mammifères. Il serait donc intéressant de tester cette hypothèse par approche de fragmentation des p80 de différentes espèces à partir de protéines purifiées pour tester leur capacité à interagir avec les microtubules *in vitro*. Nous pourrions aussi comparer leur affinité pour les microtubules.

5. Quelles sont les limites d'un système hétérologue Katanine-microtubules ?

Dans la littérature, les microtubules assemblés à partir de tubuline de porc sont les plus couramment utilisés pour les tests d'interaction ou d'activité des MAPs *in vitro*. Les microtubules sont dits « conservés » dans le domaine des eucaryotes de par leur organisation générale sous forme de tube dynamique et leurs fonctions. Cependant leur nature et leur organisation plus fine peuvent différer d'une cellule à l'autre, ou d'un organisme cellulaire à l'autre. La diversité des isoformes de tubulines, la présence de modification post-traductionnelles ainsi que le nombre et l'organisation des protofilaments changeant les interactions intra- et inter-dimères de tubulines, modifient les microtubules. Cela implique que les MAPs qui interagissent avec les microtubules, et qui régulent leur

dynamique et leur organisation, nécessitent une adaptation à la spécificité du microtubule. Cela soulève une question de conservation entre espèce en terme de mécanisme moléculaire de coupure des microtubules par les MSE. *Existe-il une adaptation de la MSE à la nature du microtubule ? Leur activité enzymatique est-elle différente lorsque le substrat provient d'une autre espèce ? L'interaction de la MSE avec son substrat est-elle différente lorsque le substrat provient d'une autre espèce ?* Il serait donc intéressant de comparer si l'espèce du microtubule a une conséquence sur l'activité de coupure des microtubules par la Katanine. [Johjima et al., \(2015\)](#) ont reconstitué des microtubules recombinants à partir de tubulines provenant de *Saccharomyces cerevisiae* où les MSE ne sont pas exprimées. Cela leur a permis d'y introduire des mutations. [Valenstein and Roll-Mecak, \(2016\)](#) ont créé des microtubules humains recombinants à partir de tubulines humaines exprimées dans des cellules Sf9 pour tester l'activité directe de MSE humaines. Au cours ma thèse, nous avons utilisé la Katanine^{MEI-1•MEI-2} de chez *C. elegans* comme modèle d'étude et les microtubules que nous polymérisons *in vitro* proviennent du porc ([Joly et al., 2016](#)). Une reconstitution de microtubules à partir de tubulines extraites chez *C. elegans* a été réalisée pour analyser la structure et la dynamique de ces microtubules ([Chaaban et al., 2018](#)). Il serait ainsi intéressant de purifier et polymériser les microtubules de *C. elegans* pour comparer l'affinité et le niveau d'activité de la Katanine^{MEI-1•MEI-2} avec ces microtubules. De plus, les auteurs démontrent que la croissance des microtubules est plus rapide chez *C. elegans* comparée à celle de *Bos taurus* ([Chaaban et al., 2018](#)). Nous pouvons poser l'hypothèse que si l'activité de l'enzyme n'est pas différente en fonction de l'espèce de son substrat, il est tout à fait possible que les conséquences de la coupure du microtubule sur la dynamique du microtubule soient différentes.

6. Résidus de la tubuline ciblés par la Katanine^{MEI-1•MEI-2} pour interagir avec la surface du microtubule

La coupure des microtubules par la Katanine nécessite une interaction productive avec la surface du microtubule. Nous avons montré que l'interaction entre la Katanine et les microtubules dépend de la charge des résidus impliqués. Deux études génétiques ont décrit un lien direct entre certaines mutations de la tubuline α et l'activité de la Katanine^{MEI-1•MEI-2} ([Lu et al., 2004](#); [Lu and Mains, 2005](#)). Le mutant *tba-2(sb27)* a été identifié comme suppresseur du phénotype *gain de fonction* de la Katanine^{MEI-1•MEI-2}. L'activité ectopique de la Katanine^{MEI-1•MEI-2} en mitose n'est plus toxique et sa localisation sur le fuseau mitotique n'est pas affectée. De plus, cette mutation amplifie le phénotype *perte de fonction* de la Katanine^{MEI-1•MEI-2} (mutation *mei-2(ct98)*) ([Lu and Mains, 2005](#)). La mutation *tba-2(sb27)* correspondant à la mutation E194K a donc pour conséquence d'affecter l'activité de la Katanine^{MEI-1•MEI-2}. L'hypothèse qui a été proposée est que l'interaction Katanine^{MEI-1•MEI-2}•microtubule

nécessaire à l'activité enzymatique soit altérée par cette mutation. Après avoir replacé ce résidu sur la structure du microtubule, nous avons observé que E194K est exposé à la surface du microtubule (**Figure 22**). L'hypothèse que la mutation E194K affecte l'interaction de la Katanine^{MEI-1•MEI-2} via la sous-unité MEI-2 avec la surface du microtubule est ainsi privilégiée. Pour tester cette hypothèse, il serait intéressant de purifier de la tubuline mutée à partir de ces souches de vers, et polymériser des microtubules à partir de cette tubuline mutée selon le protocole de [Chaaban et al., \(2018\)](#). Ainsi, nous pourrions tester l'interaction et l'activité de coupure de la Katanine^{MEI-1•MEI-2} avec ces microtubules mutés *in vitro*.

7. Répertoire de Katanines : conservation des domaines fonctionnels et spécificités

La Katanine^{MEI-1•MEI-2} composée de MEI-1 et MEI-2 est la Katanine la plus couramment étudiée chez *C. elegans*, de par le phénotype remarquable résultant de son inactivité en méiose (**Figure 17**). Pourtant d'autres sous-unités régulatrices sont exprimées chez *C. elegans* : les sous-unités F47G4.4 et F47G4.5. Cela suggère que ce n'est pas seulement une Katanine présente chez *C. elegans*, mais un répertoire de différentes Katanines dans un seul et même organisme. C'est aussi le cas chez d'autres espèces comme les mammifères et les plantes (exemple : *Arabidopsis thaliana*).

S'il existe plusieurs Katanines, alors *quel est le rôle des différentes Katanines chez C. elegans ? Quels sont les mécanismes cellulaires dans lesquels elles interviennent ?* Il a été décrit que les transcrits de *f47g4.4* et *f47g4.5* sont exprimés dans les neurones chez *C. elegans*. Chez les mammifères, la Katanine est requise dans les neurones pour l'élongation de l'axone. Elle est localisée dans le corps cellulaire ainsi que dans l'axone du neurone. Il est proposé que la Katanine maintienne des microtubules courts pour qu'ils soient transportés au bout de l'axone ([Ahmad et al., 1999](#)). Il serait donc intéressant d'approfondir les connaissances à propos du rôle des autres Katanines en particulier dans les neurones chez *C. elegans*. *Est-ce que plusieurs sous-unités régulatrices peuvent être exprimées dans la même cellule ? Existe-il une compétition entre les sous-unités régulatrices ?*

Le fait qu'il existe plusieurs Katanines dans le même organisme soulève des questions quant à la conservation des mécanismes d'action entre les différentes Katanines et à la spécificité de chacune des Katanines. En sachant qu'un des rôles de la sous-unité régulatrice est l'interaction avec les microtubules, *est-ce que les domaines d'interaction au substrat sont conservés entre les différentes Katanines de la même espèce ?* Des résultats préliminaires au laboratoire nous ont permis de démontrer que chacune des p80 de *C. elegans* F47G4.4, F47G4.5 et MEI-2 interagit directement avec les microtubules *in vitro*. Le domaine MTBD2 identifié chez MEI-2 est bien conservé avec F47G4.4 et F47G4.5 (**Figure 23**). Le MTBD1 de MEI-2 n'est pas strictement conservé, cependant les résidus alignés

avec le motif K8 K9 que nous avons identifiés sont des résidus chargés positivement (arginine et histidine). Enfin le motif K77 K78 n'est pas strictement conservé, mais F47G4.4 et F47G4.5 contiennent un motif lysine-lysine alignés 3 résidus après ou un motif arginine-arginine 3 résidus avant (astérisques verts sur la **Figure 23**). D'après ces observations, les déterminants moléculaires essentiels à l'interaction Katanine^{MEI-1-MEI-2}•microtubules ne sont pas strictement conservés, mais les charges de ces résidus semblent être les mêmes chez la Katanine^{MEI-1-F47G4.4} et la Katanine^{MEI-1-F47G4.5}. Sachant que nous avons démontré que l'interaction de MEI-2 avec les microtubules dépend de la charge de résidus, le mode d'interaction des p80 de *C. elegans* pourrait donc être similaire.

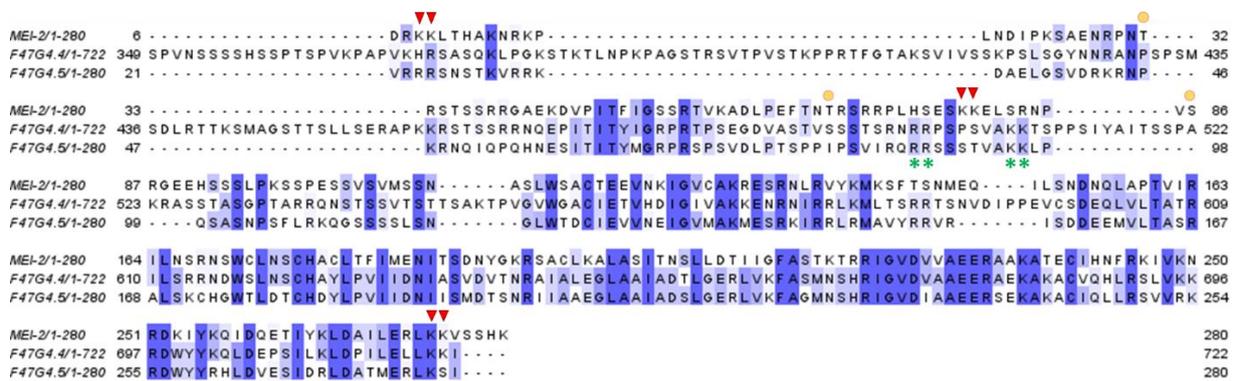


Figure 23 : Alignement de séquences protéiques des trois sous-unités régulatrices de la Katanine, MEI-2, F47G4.4 et F47G4.5 exprimées chez *C. elegans*. Alignement des séquences a été réalisé sur Jalview. Le code couleur correspond à la conservation des résidus : plus le bleu est foncé, plus le résidu est conservé entre les trois séquences. Les flèches rouges indiquent les six lysines impliquées dans l'interaction de la Katanine^{MEI-1-MEI-2} avec les microtubules que nous avons identifiés dans notre seconde étude. Les astérisques verts indiquent les résidus chargés positivement proches des deux lysines. Les ronds jaunes indiquent les résidus de MEI-2 phosphorylés par MBK-2 que nous avons identifiés (Joly et al., 2020).

De nombreuses questions concernant leur spécificité restent à poser. *Quelle est la spécificité de chacune des Katanines au sein d'un même organisme ? L'affinité avec les microtubules peut-elle être une spécificité ? Ont-elles une efficacité de coupure des microtubules qui est différente ? Coupent-elles les mêmes microtubules ?* Pour cela, nous pourrions les purifier pour d'abord s'assurer qu'elles forment un complexe stable et actif avec MEI-1. Puis nous testerons *in vitro* leur affinité pour les microtubules ainsi que leur efficacité de coupure des microtubules. Si celles-ci sont différentes, cela pourrait être un mode de régulation de leur activité efficace en fonction des types cellulaires dans lesquels elles sont exprimées et selon le niveau d'activité nécessaire aux événements cellulaires auxquels elles participent.

8. Régulation de l'activité de la Katanine par compétition avec les MTBD

Un excès d'activité de la Katanine a été décrit comme toxique chez *C. elegans* et associé à de nombreuses pathologies et cas de cancers chez l'humain. Il est donc crucial de savoir contrôler l'activité de la Katanine dans ce type de contexte pathologique. Nous avons montré que la sous-unité régulatrice qui assure l'interaction de la Katanine avec les microtubules est une actrice majeure dans la régulation de l'activité de la Katanine. *Serait-il possible de limiter l'interaction de la Katanine avec les microtubules ?* Pour cela, il faudrait bloquer l'activité de la Katanine en limitant l'accessibilité à son substrat. Nous pourrions surexprimer des peptides codant pour les MTBD de la Katanine pour ainsi couvrir le microtubule sur les cibles de la Katanine et limiter son activité de coupure. Ou alors, réaliser la manipulation inverse en surexprimant des peptides du microtubule ciblés par la Katanine pour bloquer les MTBDs de la Katanine et l'empêcher d'atteindre la surface du microtubule. La seconde option serait à privilégier pour éviter de bloquer l'accessibilité du microtubule à de nombreuses autres MAPs dans la cellule. Cette expérimentation peut être réalisée *in vitro* à partir de protéines purifiées, en suivant l'activité de coupure des microtubules par la Katanine ou *in vivo* chez *C. elegans* en analysant l'assemblage du fuseau méiotique par la Katanine et la formation des globules polaires, comme rapporteurs de l'activité de la Katanine.

Références bibliographiques

- Ahmad, F. J., Yu, W., McNally, F. J. and Baas, P. W.** (1999). An Essential Role for Katanin in Severing Microtubules in the Neuron. *J. Cell Biol.* **145**, 305–315.
- Akhmanova, A. and Hoogenraad, C. C.** (2015). Microtubule Minus-End-Targeting Proteins. *Curr. Biol.* **25**, R162–R171.
- Akhmanova, A. and Kapitein, L. C.** (2022). Mechanisms of microtubule organization in differentiated animal cells. *Nat. Rev. Mol. Cell Biol.* 1–18.
- Akhmanova, A. and Steinmetz, M. O.** (2015). Control of microtubule organization and dynamics: two ends in the limelight. *Nat. Rev. Mol. Cell Biol.* **16**, 711–726.
- Akhmanova, A. and Steinmetz, M. O.** (2019). Microtubule minus-end regulation at a glance. *J. Cell Sci.* **132**, jcs227850.
- Bailey, M. E., Sackett, D. L. and Ross, J. L.** (2015). Katanin Severing and Binding Microtubules Are Inhibited by Tubulin Carboxy Tails. *Biophys. J.* **109**, 2546–2561.
- Becker, R., Leone, M. and Engel, F. B.** (2020). Microtubule Organization in Striated Muscle Cells. *Cells* **9**, 1395.
- Belanto, J. J., Mader, T. L., Eckhoff, M. D., Strandjord, D. M., Banks, G. B., Gardner, M. K., Lowe, D. A. and Ervasti, J. M.** (2014). Microtubule binding distinguishes dystrophin from utrophin. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* **111**, 5723–5728.
- Belonogov, L., Bailey, M. E., Tyler, M. A., Kazemi, A. and Ross, J. L.** (2019). Katanin catalyzes microtubule depolymerization independently of tubulin C-terminal tails. *Cytoskeleton* **76**, 254–268.
- Bodakuntla, S., Janke, C. and Magiera, M. M.** (2021). Tubulin polyglutamylation, a regulator of microtubule functions, can cause neurodegeneration. *Neurosci. Lett.* 135656.
- Buster, D., McNally, K. and McNally, F. J.** (2002). Katanin inhibition prevents the redistribution of γ -tubulin at mitosis. *J. Cell Sci.* **115**, 1083–1092.
- Chaaban, S. and Brouhard, G. J.** (2017). A microtubule bestiary: structural diversity in tubulin polymers. *Mol. Biol. Cell* **28**, 2924–2931.
- Chaaban, S., Jariwala, S., Hsu, C.-T., Redemann, S., Kollman, J. M., Müller-Reichert, T., Sept, D., Bui, K. H. and Brouhard, G. J.** (2018). The Structure and Dynamics of *C. elegans* Tubulin Reveals the Mechanistic Basis of Microtubule Growth. *Dev. Cell* **47**, 191-204.e8.
- Chen, Q., Lin, F., Lin, E., Huang, Q. and Wu, G.** (2020). Katanin P60 and P80 in papillary thyroid carcinoma patients: Indicators for exacerbated tumor features and worse disease-free survival. *J. Clin. Lab. Anal.* **34**, e23502.
- Cheng, K. C.-C., Klancer, R., Singson, A. and Seydoux, G.** (2009). Regulation of MBK-2/DYRK by CDK-1 and the Pseudophosphatases EGG-4 and EGG-5 during the Oocyte-to-Embryo Transition. *Cell* **139**, 560–572.
- Cheung, K., Senese, S., Kuang, J., Bui, N., Ongpipattanakul, C., Gholkar, A., Cohn, W., Capri, J., Whitelegge, J. P. and Torres, J. Z.** (2016). Proteomic Analysis of the Mammalian Katanin Family of Microtubule-severing Enzymes Defines Katanin p80 subunit B-like 1 (KATNBL1) as a Regulator of Mammalian Katanin Microtubule-severing. *Mol. Cell. Proteomics* **15**, 1658–1669.
- Chrétien, D. and Wade, R. H.** (1991). New data on the microtubule surface lattice. *Biol. Cell* **71**, 161–174.

- Chuang, C.-H., Schlientz, A. J., Yang, J. and Bowerman, B.** (2020). Microtubule assembly and pole coalescence: early steps in *Caenorhabditis elegans* oocyte meiosis I spindle assembly. *Biol. Open* **9**, bio052308.
- Clandinin, T. and Mains, P. E.** (1993). Genetic studies of mei-1 gene activity during the transition from meiosis to mitosis in *Caenorhabditis elegans*. *Genetics*.
- Clark-Maguire, S. and Mains, P. E.** (1994a). mei-1, a Gene Required for Meiotic Spindle Formation in *Caenorhabditis elegans*, Is a Member of a Family of ATPases. *Genetics* **14**.
- Clark-Maguire, S. and Mains, P. E.** (1994b). Localization of the mei-1 Gene Product of *Caenorhabditis elegans*, a Meiotic-specific Spindle Component. *J. Cell Biol.* **126**, 11.
- Connolly, A. A., Osterberg, V., Christensen, S., Price, M., Lu, C., Chicas-Cruz, K., Lockery, S., Mains, P. E. and Bowerman, B.** (2014). *Caenorhabditis elegans* oocyte meiotic spindle pole assembly requires microtubule severing and the calponin homology domain protein ASPM-1. *Mol. Biol. Cell* **25**, 1298–1311.
- Cox, G. A., Mahaffey, C. L., Nystuen, A., Letts, V. A. and Frankel, W. N.** (2000). The mouse fidgetin gene defines a new role for AAA family proteins in mammalian development. *Nat. Genet.* **26**, 198–202.
- Dow, M. R. and Mains, P. E.** (1998). Genetic and Molecular Characterization of the *Caenorhabditis elegans* Gene, mel-26, a Postmeiotic Negative Regulator of MEI-1, a Meiotic-Specific Spindle Component | *Genetics* | Oxford Academic.
- Dráber, P. and Dráberová, E.** (2021). Dysregulation of Microtubule Nucleating Proteins in Cancer Cells. *Cancers* **13**, 5638.
- Dunleavy, J. E. M., Okuda, H., O'Connor, A. E., Merriner, D. J., O'Donnell, L., Jamsai, D., Bergmann, M. and O'Bryan, M. K.** (2017). Katanin-like 2 (KATNAL2) functions in multiple aspects of haploid male germ cell development in the mouse. *PLOS Genet.* **13**, e1007078.
- Eckert, T., Le, D. T.-V., Link, S., Friedmann, L. and Woehlke, G.** (2012). Spastin's Microtubule-Binding Properties and Comparison to Katanin. *PLoS ONE* **7**, e50161.
- Faltova, L., Jiang, K., Frey, D., Wu, Y., Capitani, G., Prota, A. E., Akhmanova, A., Steinmetz, M. O. and Kammerer, R. A.** (2019). Crystal Structure of a Heterotetrameric Katanin p60:p80 Complex. *Structure* **27**, 1375-1383.e3.
- Frøkjær-Jensen, C., Wayne Davis, M., Hopkins, C. E., Newman, B. J., Thummel, J. M., Olesen, S.-P., Grunnet, M. and Jorgensen, E. M.** (2008). Single-copy insertion of transgenes in *Caenorhabditis elegans*. *Nat. Genet.* **40**, 1375–1383.
- Fu, W., Wu, H., Cheng, Z., Huang, S. and Rao, H.** (2018). The role of katanin p60 in breast cancer bone metastasis. *Oncol. Lett.*
- Furtado, M. B., Merriner, D. J., Berger, S., Rhodes, D., Jamsai, D. and O'Bryan, M. K.** (2017). Mutations in the *Katnb1* gene cause left-right asymmetry and heart defects: *Katnb1* Gene Mutations Cause Asymmetry and Heart Defects. *Dev. Dyn.* **246**, 1027–1035.
- Furukawa, M., He, Y. J., Borchers, C. and Xiong, Y.** (2003). Targeting of protein ubiquitination by BTB–Cullin 3–Roc1 ubiquitin ligases. *Nat. Cell Biol.* **5**, 1001–1007.
- Gomes, J.-E., Tavernier, N., Richaudeau, B., Formstecher, E., Boulin, T., Mains, P. E., Dumont, J. and Pintard, L.** (2013). Microtubule severing by the katanin complex is activated by PPFR-1-dependent MEI-1 dephosphorylation. *J. Cell Biol.* **202**, 431–439.
- Greenstein, D.** (2005). *Control of oocyte meiotic maturation and fertilization*. WormBook.

- Han, X., Gomes, J.-E., Birmingham, C. L., Pintard, L., Sugimoto, A. and Mains, P. E.** (2009). The Role of Protein Phosphatase 4 in Regulating Microtubule Severing in the *Caenorhabditis elegans* Embryo. *Genetics* **181**, 933–943.
- Han, H., Schubert, H. L., McCullough, J., Monroe, N., Purdy, M. D., Yeager, M., Sundquist, W. I. and Hill, C. P.** (2020). Structure of spastin bound to a glutamate-rich peptide implies a hand-over-hand mechanism of substrate translocation. *J. Biol. Chem.* **295**, 435–443.
- Harris, J. E., Govindan, J. A., Yamamoto, I., Schwartz, J., Kaverina, I. and Greenstein, D.** (2006). Major sperm protein signaling promotes oocyte microtubule reorganization prior to fertilization in *Caenorhabditis elegans*. *Dev. Biol.* **299**, 105–121.
- Hartman, J. J., Mahr, J., McNally, K., Okawa, K., Iwamatsu, A., Thomas, S., Cheesman, S., Heuser, J., Vale, R. D. and McNally, F. J.** (1998). Katanin, a Microtubule-Severing Protein, Is a Novel AAA ATPase that Targets to the Centrosome Using a WD40-Containing Subunit. *Cell* **93**, 277–287.
- Hattersley, N., Lara-Gonzalez, P., Cheerambathur, D., Gomez-Cavazos, J. S., Kim, T., Prevo, B., Khaliullin, R., Lee, K.-Y., Ohta, M., Green, R., et al.** (2018). Chapter 9 - Employing the one-cell *C. elegans* embryo to study cell division processes. In *Methods in Cell Biology* (ed. Maiato, H.) and Schuh, M.), pp. 185–231. Academic Press.
- Hazan, J., Fonknechten, N., Mavel, D., Paternotte, C., Samson, D., Artiguenave, F., Davoine, C.-S., Cruaud, C., Dürr, A., Wincker, P., et al.** (1999). Spastin, a new AAA protein, is altered in the most frequent form of autosomal dominant spastic paraplegia. *Nat. Genet.* **23**, 296–303.
- Hu, Z., Feng, J., Bo, W., Wu, R., Dong, Z., Liu, Y., Qiang, L. and Liu, M.** (2017). Fidgetin regulates cultured astrocyte migration by severing tyrosinated microtubules at the leading edge. *Mol. Biol. Cell* **28**, 545–553.
- Janke, C. and Magiera, M. M.** (2020). The tubulin code and its role in controlling microtubule properties and functions. *Nat. Rev. Mol. Cell Biol.* **21**, 307–326.
- Jiang, K., Hua, S., Mohan, R., Grigoriev, I., Yau, K. W., Liu, Q., Katrukha, E. A., Altelaar, A. F. M., Heck, A. J. R., Hoogenraad, C. C., et al.** (2014). Microtubule Minus-End Stabilization by Polymerization-Driven CAMSAP Deposition. *Dev. Cell* **28**, 295–309.
- Jiang, K., Rezabkova, L., Hua, S., Liu, Q., Capitani, G., Altelaar, A. F. M., Heck, A. J. R., Kammerer, R. A., Steinmetz, M. O. and Akhmanova, A.** (2017). Microtubule minus-end regulation at spindle poles by an ASPM–katanin complex. *Nat. Cell Biol.* **19**, 480–492.
- Jiang, K., Faltova, L., Hua, S., Capitani, G., Prota, A. E., Landgraf, C., Volkmer, R., Kammerer, R. A., Steinmetz, M. O. and Akhmanova, A.** (2018). Structural Basis of Formation of the Microtubule Minus-End-Regulating CAMSAP-Katanin Complex. *Structure* **26**, 375-382.e4.
- Johjima, A., Noi, K., Nishikori, S., Ogi, H., Esaki, M. and Ogura, T.** (2015). Microtubule Severing by Katanin p60 AAA+ ATPase Requires the C-terminal Acidic Tails of Both α - and β -Tubulins and Basic Amino Acid Residues in the AAA+ Ring Pore. *J. Biol. Chem.* **290**, 11762–11770.
- Joly, N., Martino, L., Gigant, E., Dumont, J. and Pintard, L.** (2016). Microtubule-severing activity of the AAA+ ATPase Katanin is essential for female meiotic spindle assembly. *Development* **143**, 3604–3614.
- Joly, N., Beaumale, E., Van Hove, L., Martino, L. and Pintard, L.** (2020). Phosphorylation of the microtubule-severing AAA+ enzyme Katanin regulates *C. elegans* embryo development. *J. Cell Biol.* **219**.
- Kuo, Y.-W., Trottier, O., Mahamdeh, M. and Howard, J.** (2019). Spastin is a dual-function enzyme that severs microtubules and promotes their regrowth to increase the number and mass of microtubules. *Proc. Natl. Acad. Sci.* **116**, 5533–5541.

- Kuo, Y.-W., Mahamdeh, M., Tuna, Y. and Howard, J.** (2022). The force required to remove tubulin from the microtubule lattice by pulling on its α -tubulin C-terminal tail. *Nat. Commun.* **13**, 3651.
- Kurz, T., Pintard, L., Willis, J. H., Hamill, D. R., Gönczy, P., Peter, M. and Bowerman, B.** (2002). Cytoskeletal Regulation by the Nedd8 Ubiquitin-Like Protein Modification Pathway. *Science* **295**, 1294–1298.
- Laband, K., Le Borgne, R., Edwards, F., Stefanutti, M., Canman, J. C., Verbavatz, J.-M. and Dumont, J.** (2017). Chromosome segregation occurs by microtubule pushing in oocytes. *Nat. Commun.* **8**, 1499.
- Lacroix, B., van Dijk, J., Gold, N. D., Guizetti, J., Aldrian-Herrada, G., Rogowski, K., Gerlich, D. W. and Janke, C.** (2010). Tubulin polyglutamylation stimulates spastin-mediated microtubule severing. *J. Cell Biol.* **189**, 945–954.
- Lantsch, I., Yu, C.-H., Chen, Y.-Z., Zimyanin, V., Yazdkhasti, H., Lindow, N., Szentgyoergyi, E., Pani, A. M., Prohaska, S., Srayko, M., et al.** (2021). Microtubule re-organization during female meiosis in *C. elegans*. *eLife* **10**, e58903.
- Li, X., Liu, J., Shi, P.-F. and Fu, P.** (2018). Katanin P80 expression correlates with lymph node metastasis and worse overall survival in patients with breast cancer. *Cancer Biomark.* **23**, 363–371.
- Lindeboom, J., Nakamura, M., Hibbel, A., Shundyak, K., Gutierrez, R., Katelaar, T., Emons, A. M., Mulder, B. M., Kirit, V. and Ehrhardt, D. W.** (2013). A mechanism for reorientation of cortical microtubule arrays driven by microtubule severing. *Science* **342**, 13.
- Liu, Q., Zhang, G., Ji, Z. and Lin, H.** (2021). Molecular and cellular mechanisms of spastin in neural development and disease (Review). *Int. J. Mol. Med.* **48**, 1–13.
- Lohret, T. A., McNally, F. J. and Quarmby, L. M.** (1998). A Role for Katanin-mediated Axonemal Severing during *Chlamydomonas* Deflagellation. *Mol. Biol. Cell* **9**, 1195–1207.
- Loughlin, R., Wilbur, J. D., McNally, F. J., Nédélec, F. J. and Heald, R.** (2011). Katanin Contributes to Interspecies Spindle Length Scaling in *Xenopus*. *Cell* **147**, 1397–1407.
- Lu, C. and Mains, P. E.** (2005). Mutations of a Redundant α -Tubulin Gene Affect *Caenorhabditis elegans* Early Embryonic Cleavage via MEI-1/Katanin-Dependent and -Independent Pathways. *Genetics* **170**, 115–126.
- Lu, C., Srayko, M. and Mains, P. E.** (2004). The *Caenorhabditis elegans* Microtubule-severing Complex MEI-1/MEI-2 Katanin Interacts Differently with Two Superficially Redundant α -Tubulin Isoforms. *Mol. Biol. Cell* **15**, 9.
- Luke-Glaser, S., Pintard, L., Tyers, M. and Peter, M.** (2007). The AAA-ATPase FIGL-1 controls mitotic progression, and its levels are regulated by the CUL-3MEL-26 E3 ligase in the *C. elegans* germ line. *J. Cell Sci.* **120**, 3179–3187.
- Lynn, N. A., Martinez, E., Nguyen, H. and Torres, J. Z.** (2021). The Mammalian Family of Katanin Microtubule-Severing Enzymes. *Front. Cell Dev. Biol.* **9**, 692040.
- Mains, P. E., Kempthues, K., Sprunger, S. A. and Wood, W. B.** (1990a). Mutations Affecting the Meiotic and Mitotic Divisions of the Early *Caenorhabditis elegans* Embryo. *Genetics* **13**.
- Mains, P. E., Sulston, I. A. and Wood, W. B.** (1990b). Dominant maternal-effect mutations causing embryonic lethality in *Caenorhabditis elegans*. *Genetics*.
- Martin, M. and Akhmanova, A.** (2018). Coming into Focus: Mechanisms of Microtubule Minus-End Organization. *Trends Cell Biol.* **28**, 574–588.

- Matsushita-Ishiodori, Y., Yamanaka, K. and Ogura, T.** (2007). The *C. elegans* homologue of the spastic paraplegia protein, spastin, disassembles microtubules. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* **359**, 157–162.
- Matsushita-Ishiodori, Y., Yamanaka, K., Hashimoto, H., Esaki, M. and Ogura, T.** (2009). Conserved aromatic and basic amino acid residues in the pore region of *Caenorhabditis elegans* spastin play critical roles in microtubule severing. *Genes Cells* **14**, 925–940.
- McHugh, T., Zou, J., Volkov, V. A., Bertin, A., Talapatra, S. K., Rappsilber, J., Dogterom, M. and Welburn, J. P. I.** (2019). The depolymerase activity of MCAK shows a graded response to Aurora B kinase phosphorylation through allosteric regulation. *J. Cell Sci.*
- McNally, K. P. and McNally, F. J.** (2011). The spindle assembly function of *Caenorhabditis elegans* katanin does not require microtubule-severing activity. *Mol. Biol. Cell* **22**, 1550–1560.
- McNally, F. J. and Thomas, S.** (1998). Katanin Is Responsible for the M-Phase Microtubule-severing Activity in *Xenopus* Eggs. *Mol. Biol. Cell* **9**, 1847–1861.
- McNally, F. J. and Vale, R. D.** (1993). Identification of katanin, an ATPase that severs and disassembles stable microtubules. *Cell* **75**, 419–429.
- McNally, K. P., Bazirgan, O. A. and McNally, F. J.** (2000). Two domains of p80 regulate microtubule severing and spindle pole targeting by p60 katanin. *J. Cell Sci.* **11**.
- McNally, K., Audhya, A., Oegema, K. and McNally, F. J.** (2006). Katanin controls mitotic and meiotic spindle length. *J. Cell Biol.* **175**, 881–891.
- McNally, K., Berg, E., Cortes, D. B., Hernandez, V., Mains, P. E. and McNally, F. J.** (2014). Katanin maintains meiotic metaphase chromosome alignment and spindle structure in vivo and has multiple effects on microtubules in vitro. *Mol. Biol. Cell* **25**, 1037–1049.
- Ming Pang, K., Ishidate, T., Nakamura, K., Shirayama, M., Trzepacz, C., Schubert, C. M., Priess, J. R. and Mello, C. C.** (2004). The minibrain kinase homolog, mbk-2, is required for spindle positioning and asymmetric cell division in early *C. elegans* embryos. *Dev. Biol.* **265**, 127–139.
- Mishra-Gorur, K., Çağlayan, A. O., Schaffer, A. E., Chabu, C., Henegariu, O., Vonhoff, F., Akgümüş, G. T., Nishimura, S., Han, W., Tu, S., et al.** (2014). Mutations in KATNB1 Cause Complex Cerebral Malformations by Disrupting Asymmetrically Dividing Neural Progenitors. *Neuron* **84**, 1226–1239.
- Mukherjee, S., Valencia, J. D. D., Stewman, S., Metz, J., Monnier, S., Rath, U., Asenjo, A. B., Charafeddine, R. A., Sosa, H. J., Ross, J. L., et al.** (2012). Human Fidgetin is a microtubule severing enzyme and minus-end depolymerase that regulates mitosis. *Cell Cycle* **11**, 2359–2366.
- Mullen, T. J., Davis-Roca, A. C. and Wignall, S. M.** (2019). Spindle assembly and chromosome dynamics during oocyte meiosis. *Curr. Opin. Cell Biol.* **60**, 53–59.
- Müller-Reichert, T., Greenan, G., O’Toole, E. and Srayko, M.** (2010). The elegans of spindle assembly. *Cell. Mol. Life Sci.* **67**, 2195–2213.
- Mustyatsa, V. V., Boyakhchyan, A. V., Ataulkhanov, F. I. and Gudimchuk, N. B.** (2017). EB-family proteins: Functions and microtubule interaction mechanisms. *Biochem. Mosc.* **82**, 791–802.
- Nithianantham, S., McNally, F. J. and Al-Bassam, J.** (2018). Structural basis for disassembly of katanin heterododecamers. *J. Biol. Chem.* **293**, 10590–10605.
- Noordstra, I., Liu, Q., Nijenhuis, W., Hua, S., Jiang, K., Baars, M., Rimmelzwaal, S., Martin, M., Kapitein, L. C. and Akhmanova, A.** (2016). Control of apico–basal epithelial polarity by the microtubule minus-end-binding protein CAMSAP3 and spectraplakins ACF7. *J. Cell Sci.* **129**, 4278–4288.

- O'Donnell, L., Rhodes, D., Smith, S. J., Merriner, D. J., Clark, B. J., Borg, C., Whittle, B., O'Connor, A. E., Smith, L. B., McNally, F. J., et al.** (2012). An Essential Role for Katanin p80 and Microtubule Severing in Male Gamete Production. *PLoS Genet.* **8**, e1002698.
- O'Donnell, L., McLachlan, R. I., Merriner, D. J., O'Bryan, M. K. and Jamsai, D.** (2014). KATNB1 in the human testis and its genetic variants in fertile and oligoasthenoteratozoospermic infertile men. *Andrology* **2**, 884–891.
- Onitake, A., Yamanaka, K., Esaki, M. and Ogura, T.** (2012). Caenorhabditis elegans fidgetin homolog FIGL-1, a nuclear-localized AAA ATPase, binds to SUMO. *J. Struct. Biol.* **179**, 143–151.
- O'Rourke, S. M., Carter, C., Carter, L., Christensen, S. N., Jones, M. P., Nash, B., Price, M. H., Turnbull, D. W., Garner, A. R., Hamill, D. R., et al.** (2011). A Survey of New Temperature-Sensitive, Embryonic-Lethal Mutations in *C. elegans*: 24 Alleles of Thirteen Genes. *PLOS ONE* **6**, e16644.
- Pellettieri, J., Reinke, V., Kim, S. K. and Seydoux, G.** (2003). Coordinate Activation of Maternal Protein Degradation during the Egg-to-Embryo Transition in *C. elegans*. *Dev. Cell* **5**, 451–462.
- Peng, W., Lin, Z., Li, W., Lu, J., Shen, Y. and Wang, C.** (2013). Structural Insights into the Unusually Strong ATPase Activity of the AAA Domain of the Caenorhabditis elegans Fidgetin-like 1 (FIGL-1) Protein*. *J. Biol. Chem.* **288**, 29305–29312.
- Pintard, L. and Bowerman, B.** (2019). Mitotic Cell Division in Caenorhabditis elegans. *Genetics* **211**, 35–73.
- Pintard, L., Kurz, T., Glaser, S., Willis, J. H., Peter, M. and Bowerman, B.** (2003a). Neddylation and Deneddylation of CUL-3 Is Required to Target MEI-1/Katanin for Degradation at the Meiosis-to-Mitosis Transition in *C. elegans*. *Curr. Biol.* **13**, 911–921.
- Pintard, L., Willis, J. H., Willems, A., Johnson, J.-L. F., Srayko, M., Kurz, T., Glaser, S., Mains, P. E., Tyers, M., Bowerman, B., et al.** (2003b). The BTB protein MEL-26 is a substrate-specific adaptor of the CUL-3 ubiquitin-ligase. *Nature* **425**, 311–316.
- Pintard, L., Willems, A. and Peter, M.** (2004). Cullin-based ubiquitin ligases: Cul3–BTB complexes join the family. *EMBO J.* **23**, 1681–1687.
- Prosser, S. L. and Pelletier, L.** (2017). Mitotic spindle assembly in animal cells: a fine balancing act. *Nat. Rev. Mol. Cell Biol.* **18**, 187–201.
- Quintin, S., Mains, P. E., Zinke, A. and Hyman, A. A.** (2003). The mbk-2 kinase is required for inactivation of MEI-1/katanin in the one-cell Caenorhabditis elegans embryo. *EMBO Rep.* **4**, 1175–1181.
- Ramkumar, A., Jong, B. Y. and Ori-McKenney, K. M.** (2017). ReMAPping the microtubule landscape: How phosphorylation dictates the activities of microtubule-associated proteins. *Am. Assoc. Anat.*
- Rezabkova, L., Jiang, K., Capitani, G., Prota, A. E., Akhmanova, A., Steinmetz, M. O. and Kammerer, R. A.** (2017). Structural basis of katanin p60:p80 complex formation. *Sci. Rep.* **7**, 14893.
- Roll-Mecak, A.** (2020). The Tubulin Code in Microtubule Dynamics and Information Encoding. *Dev. Cell* **54**, 7–20.
- Roll-Mecak, A. and McNally, F. J.** (2010). Microtubule-severing enzymes. *Curr. Opin. Cell Biol.* **22**, 96–103.
- Roll-Mecak, A. and Vale, R. D.** (2005). The Drosophila Homologue of the Hereditary Spastic Paraplegia Protein, Spastin, Severs and Disassembles Microtubules. *Curr. Biol.* **15**, 650–655.
- Roll-Mecak, A. and Vale, R. D.** (2006). Making more microtubules by severing: a common theme of noncentrosomal microtubule arrays? *J. Cell Biol.* **175**, 849–851.

- Roll-Mecak, A. and Vale, R. D.** (2008). Structural basis of microtubule severing by the hereditary spastic paraplegia protein spastin. *Nature* **451**, 363–367.
- Sandate, C. R., Szyk, A., Zehr, E. A., Lander, G. C. and Roll-Mecak, A.** (2019). An allosteric network in spastin couples multiple activities required for microtubule severing. *Nat. Struct. Mol. Biol.* **26**, 671–678.
- Sanhaji, M., Friel, C. T., Wordeman, L., Louwen, F. and Yuan, J.** (2011). Mitotic centromere-associated kinesin (MCAK): a potential cancer drug target. *Oncotarget* **2**, 935–947.
- Schapira, M., Tyers, M., Torrent, M. and Arrowsmith, C. H.** (2017). WD40 repeat domain proteins: a novel target class? *Nat. Rev. Drug Discov.* **16**, 773–786.
- Seraphim, T. V. and Houry, W. A.** (2020). AAA+ proteins. *Curr. Biol.* **30**, R251–R257.
- Sharma, N., Bryant, J., Wloga, D., Donaldson, R., Davis, R. C., Jerka-Dziadosz, M. and Gaertig, J.** (2007). Katanin regulates dynamics of microtubules and biogenesis of motile cilia. *J. Cell Biol.* **178**, 1065–1079.
- Smith, L. B., Milne, L., Nelson, N., Eddie, S., Brown, P., Atanassova, N., O'Bryan, M. K., O'Donnell, L., Rhodes, D., Wells, S., et al.** (2012). KATNAL1 Regulation of Sertoli Cell Microtubule Dynamics Is Essential for Spermiogenesis and Male Fertility. *PLoS Genet.* **8**, e1002697.
- Soppa, U. and Becker, W.** (2015). DYRK protein kinases. *Curr. Biol.* **25**, R488–R489.
- Srayko, M., Buster, D. W., Bazirgan, O. A., McNally, F. J. and Mains, P. E.** (2000). MEI-1/MEI-2 katanin-like microtubule severing activity is required for *Caenorhabditis elegans* meiosis. *Genes Dev.* **13**.
- Srayko, M., O'Toole, E. T., Hyman, A. A. and Müller-Reichert, T.** (2006). Katanin Disrupts the Microtubule Lattice and Increases Polymer Number in *C. elegans* Meiosis. *Curr. Biol.* **16**, 1944–1949.
- Stitzel, M. L., Pellettieri, J. and Seydoux, G.** (2006). The *C. elegans* DYRK Kinase MBK-2 Marks Oocyte Proteins for Degradation in Response to Meiotic Maturation. *Curr. Biol.* **16**, 56–62.
- Stitzel, M. L., Cheng, K. C.-C. and Seydoux, G.** (2007). Regulation of MBK-2/Dyrk Kinase by Dynamic Cortical Anchoring during the Oocyte-to-Zygote Transition. *Curr. Biol.* **17**, 1545–1554.
- Stoppin-Mellet, V., Gaillard, J. and Vantard, M.** (2002). Functional evidence for in vitro microtubule severing by the plant katanin homologue. *Biochem. J.* **365**, 337–342.
- Stoppin-Mellet, V., Gaillard, J., Timmers, T., Neumann, E., Conway, J. and Vantard, M.** (2007). Arabidopsis katanin binds microtubules using a multimeric microtubule-binding domain. *Plant Physiol. Biochem.* **45**, 867–877.
- Sudo, H. and Baas, P. W.** (2010). Acetylation of Microtubules Influences Their Sensitivity to Severing by Katanin in Neurons and Fibroblasts. *J. Neurosci.* **30**, 7215–7226.
- Taylor, S. R., Santpere, G., Weinreb, A., Barrett, A., Reilly, M. B., Xu, C., Varol, E., Oikonomou, P., Glenwinkel, L., McWhirter, R., et al.** (2021). Molecular topography of an entire nervous system. *Cell* **184**, 4329–4347.e23.
- Vale, R. D.** (1991). Severing of stable microtubules by a mitotically activated protein in xenopus egg extracts. *Cell* **64**, 827–839.
- Valenstein, M. L. and Roll-Mecak, A.** (2016). Graded Control of Microtubule Severing by Tubulin Glutamylation. *Cell* **164**, 911–921.

- Vemu, A., Szczesna, E., Zehr, E. A., Spector, J. O., Grigorieff, N., Deaconescu, A. M. and Roll-Mecak, A.** (2018). Severing enzymes amplify microtubule arrays through lattice GTP-tubulin incorporation. *Science* **361**, eaau1504.
- Walczak, C. E. and Shaw, S. L.** (2010). A MAP for Bundling Microtubules. *Cell* **142**, 364–367.
- Wang, C., Liu, W., Wang, G., Li, J., Dong, L., Han, L., Wang, Q., Tian, J., Yu, Y., Gao, C., et al.** (2017). KTN80 confers precision to microtubule severing by specific targeting of katanin complexes in plant cells. *EMBO J.* **36**, 3435–3447.
- Wang, L., Tantai, J. and Zhu, X.** (2020). Katanin P60: a potential biomarker for lymph node metastasis and prognosis for non-small cell lung cancer. *World J. Surg. Oncol.* **18**, 157.
- White, S. R., Evans, K. J., Lary, J., Cole, J. L. and Lauring, B.** (2007). Recognition of C-terminal amino acids in tubulin by pore loops in Spastin is important for microtubule severing. *J. Cell Biol.* **176**, 995–1005.
- Whitehead, E., Heald, R. and Wilbur, J. D.** (2013). N-Terminal Phosphorylation of p60 Katanin Directly Regulates Microtubule Severing. *J. Mol. Biol.* **425**, 214–221.
- Xu, L., Wei, Y., Reboul, J., Vaglio, P., Shin, T.-H., Vidal, M., Elledge, S. J. and Harper, J. W.** (2003). BTB proteins are substrate-specific adaptors in an SCF-like modular ubiquitin ligase containing CUL-3. *Nature* **425**, 316–321.
- Ye, X., Lee, Y.-C., Choueiri, M., Chu, K., Huang, C.-F., Kobayashi, R., Logothetis, C. J., Yu-Lee, L.-Y. and Lin, S.-H.** (2013). Aberrant expression of katanin p60 in prostate cancer bone metastasis. *Prostate* **16**.
- Ye, Q., Zhang, M. and Yin, Y.** (2020). Katanin P80 correlates with larger tumor size, lymph node metastasis, and advanced TNM stage and predicts poor prognosis in non-small-cell lung cancer patients. *J. Clin. Lab. Anal.*
- Yigit, G., Wiczorek, D., Bögershausen, N., Beleggia, F., Möller-Hartmann, C., Altmüller, J., Thiele, H., Nürnberg, P. and Wollnik, B.** (2016). A syndrome of microcephaly, short stature, polysyndactyly, and dental anomalies caused by a homozygous *KATNB1* mutation. *Am. J. Med. Genet. A.* **170**, 728–733.
- Zehr, E., Szyk, A., Piszczek, G., Szczesna, E., Zuo, X. and Roll-Mecak, A.** (2017). Katanin spiral and ring structures shed light on power stroke for microtubule severing. *Nat. Struct. Mol. Biol.* **24**, 717–725.
- Zehr, E. A., Szyk, A., Szczesna, E. and Roll-Mecak, A.** (2020). Katanin Grips the β -Tubulin Tail through an Electropositive Double Spiral to Sever Microtubules. *Dev. Cell* **52**, 118-131.e6.
- Zhang, D., Rogers, G. C., Buster, D. W. and Sharp, D. J.** (2007). Three microtubule severing enzymes contribute to the “Pacman-flux” machinery that moves chromosomes. *J. Cell Biol.* **177**, 231–242.
- Zhang, D., Grode, K. D., Stewman, S. F., Diaz-Valencia, J. D., Liebling, E., Rath, U., Riera, T., Currie, J. D., Buster, D. W., Asenjo, A. B., et al.** (2011). *Drosophila* katanin is a microtubule depolymerase that regulates cortical-microtubule plus-end interactions and cell migration. *Nat. Cell Biol.* **13**, 361–369.
- Zheng, Y., Chen, C., Lin, Z., Li, J., Liu, J., Lin, F. and Zhou, X.** (2019). Circ_KATNAL1 regulates prostate cancer cell growth and invasiveness through the miR-145-3p/WISP1 pathway. *Biochem. Cell Biol.*
- Zhou, B., Wang, J., Gao, J., Xie, J. and Chen, Y.** (2020). Fidgetin as a potential prognostic biomarker for hepatocellular carcinoma. *Int. J. Med. Sci.* **17**, 2888–2894.

