



HAL
open science

Caractérisation du rôle d'Ensconsine / MAP7 dans la dynamique des microtubules et des centrosomes

Emmanuel Gallaud

► **To cite this version:**

Emmanuel Gallaud. Caractérisation du rôle d'Ensconsine / MAP7 dans la dynamique des microtubules et des centrosomes. Sciences du Vivant [q-bio]. Université rennes 1, 2014. Français. <NNT : >. <tel-04705537>

HAL Id: tel-04705537

<https://hal.inrae.fr/tel-04705537v1>

Submitted on 23 Sep 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.



HAL Authorization



THÈSE / UNIVERSITÉ DE RENNES 1
sous le sceau de l'Université Européenne de Bretagne

pour le grade de
DOCTEUR DE L'UNIVERSITÉ DE RENNES 1

Mention : Biologie

Ecole doctorale Vie - Agro - Santé (VAS)

présentée par

Emmanuel Gallaud

Préparée à l'unité de recherche UMR6290 - IGDR
Institut de Génétique et Développement de Rennes
UFR Sciences de la Vie et de l'Environnement

**Caractérisation du rôle
d'Ensconsine/MAP7
dans la dynamique des
microtubules et des
centrosomes**

**Thèse soutenue à Rennes
le 23 avril 2014**

devant le jury composé de :

Anne ROYOU

CR1 CNRS, Institut Européen de Chimie et
Biologie/Institut de Biochimie et Génétique Cellulaire,
Pessac / *rapporteur*

Julien DUMONT

CR1 CNRS, Institut Jacques Monod, Paris /
rapporteur

Franck PEREZ

DR2 CNRS, Institut Curie, Paris / *examineur*

Roland LE BORGNE

DR1 CNRS, Institut de Génétique et Développement
de Rennes, Rennes / *examineur*

Laurent RICHARD-PARPAILON

MCU Université de Rennes 1, Institut de Génétique et
Développement de Rennes, Rennes / *co-directeur de
thèse*

Régis GIET

DR2 CNRS, Institut de Génétique et Développement
de Rennes, Rennes / *directeur de thèse*

| | |
|--|----------|
| INTRODUCTION – L’ASSEMBLAGE DU FUSEAU MITOTIQUE ET LE MODELE DU NEUROBLASTE DE DROSOPHILE | 1 |
| I - GENERALITES SUR LE CYCLE CELLULAIRE | 3 |
| II - STRUCTURE, ASSEMBLAGE ET REGULATION DU FUSEAU MITOTIQUE | 4 |
| A - LES MICROTUBULES, LES ORIGINES DE NUCLEATION ET LES VOIES D’ASSEMBLAGE DU FUSEAU MITOTIQUE .. | 4 |
| 1 - Le microtubule..... | 4 |
| a) Structure | 4 |
| b) Dynamique..... | 4 |
| c) Les récentes avancées..... | 5 |
| d) La matrice de nucléation : le γ -TuSC et le γ -TuRC..... | 5 |
| e) Les différentes populations de microtubules au sein du fuseau | 9 |
| 2 - Le centrosome et le modèle de « recherche et capture »..... | 11 |
| a) Structure | 11 |
| b) Cycle..... | 11 |
| c) Modèle de « recherche et capture »..... | 13 |
| d) Orientation du fuseau mitotique et le positionnement des centrosomes . | 13 |
| e) Implications dans les cancers..... | 14 |
| f) Le centrosome en interphase et phylogénie | 14 |
| 3 - La chromatine et le modèle d’auto-assemblage | 16 |
| 4 - La nucléation à partir des kinétochores..... | 17 |
| 5 - La nucléation microtubule-dépendante ou ramification..... | 19 |
| B - LES PROTEINES REGULATRICES | 20 |
| 1 - Où et pourquoi ?..... | 22 |
| 2- Les MAPs stabilisant les microtubules..... | 22 |
| a) Les +TIPs..... | 23 |
| b) Les protéines associées à la paroi des microtubules | 25 |
| c) Les -TIPs..... | 26 |
| 3 – Les protéines qui déstabilisent les microtubules..... | 27 |
| a) Les kinésines déstabilisatrices..... | 27 |
| b) Le clivage..... | 28 |
| c) La séquestration des dimères de tubuline | 29 |
| 4- Les modifications post-traductionnelles..... | 29 |
| 5 – Les moteurs..... | 31 |
| a) La séparation des centrosomes et l’établissement de la bipolarité..... | 31 |

| | |
|--|-----------|
| b) Le maintien de la bipolarité | 34 |
| c) L'intégrité des pôles | 35 |
| d) La congression par les chromokinésines..... | 37 |
| C - LE POINT DE CONTROLE DE L'ASSEMBLAGE DU FUSEAU MITOTIQUE..... | 39 |
| 1 – La structure du kinétochore..... | 39 |
| 2 – Les modes d'attachement et les corrections d'erreurs | 41 |
| 3 – La régulation du point de contrôle | 43 |
| III - LE NEUROBLASTE DE DROSOPHILE | 46 |
| A - POLARITE CELLULAIRE ET ASYMETRIE DE DIVISION..... | 47 |
| 1 - Le neuroblaste et sa polarité | 47 |
| a) Les différents types de neuroblastes | 47 |
| b) La polarité apico-basale | 49 |
| 2 - L'orientation et l'ancrage du fuseau..... | 53 |
| a) La polarité dicte l'orientation du fuseau..... | 53 |
| b) La mémoire de l'orientation du fuseau lors de divisions successives..... | 55 |
| B - L'HOMÉOSTASIE DU SYSTÈME NERVEUX CENTRAL LARVAIRE ET SES DÉRÈGLEMENTS | 57 |
| IV - OBJECTIFS DE THESE..... | 59 |
| | |
| <u>RESULTATS - CARACTERISATION DU ROLE D'ENSCONSINE/MAP7 DANS LA DYNAMIQUE DES</u> | |
| <u>MICROTUBULES ET DES CENTROSOMES.....</u> | 61 |
| I - L'APPROCHE PROTEOMIQUE ET LE CRIBLE PAR ARNI | 62 |
| II - LA PROTEINE ENSCONSINE..... | 63 |
| III - LES PRINCIPAUX RESULTATS | 64 |
| IV - ENSCONSIN/MAP7 PROMOTES MICROTUBULE GROWTH AND CENTROSOME SEPARATION IN <i>DROSOPHILA</i> NEURAL STEM CELLS..... | 66 |
| | |
| <u>CONCLUSIONS, DISCUSSION & PERSPECTIVES.....</u> | 83 |
| I - L'INTERACTOME DES MICROTUBULES DE L'EMBRYON DE DROSOPHILE ET ANALYSE FONCTIONNELLE | 84 |
| A - L'APPROCHE PROTEOMIQUE..... | 84 |
| B - LE CRIBLE PAR ARNI | 84 |
| C - LES CANDIDATS MIS EN EVIDENCE | 86 |
| II - LE ROLE D'ENSCONSINE DANS LA DYNAMIQUE DES MICROTUBULES | 88 |
| III - LA KINESINE-1, PARTENAIRE FONCTIONNEL D'ENSCONSINE | 91 |
| A - VERS UNE MEILLEURE COMPREHENSION DES FONCTIONS DES DOMAINES EHR1 ET EHR2 D'ENSCONSINE ET DU LIEN AVEC LA KINESINE-1..... | 91 |

| | |
|---|------------------|
| B - LE ROLE DE KINESINE-1 ET ENSCONSINE DANS LA DYNAMIQUE DES CENTROSOMES | 92 |
| 1 - Une fonction indépendante de la dynamique des microtubules | 92 |
| 2 - La Kinésine-1 et l'ancrage des centrosomes à l'enveloppe nucléaire | 93 |
| 3 - Parallèle avec les cellules souches de la lignée germinale mâle..... | 94 |
| 4 - Le positionnement des asters et la fidélité de l'orientation l'axe de division | 94 |
| 5 - La perte de fonction d'Enscosine favorise l'intégrité des pôles des fuseaux acentriolaires | 95 |
| IV - CONCLUSIONS GENERALES..... | 96 |
| <u>REFERENCES BIBLIOGRAPHIQUES</u> | <u>97</u> |

Tables des figures

| | |
|--|----|
| FIGURE 1 : LE CYCLE CELLULAIRE..... | 2 |
| FIGURE 2 : LA STRUCTURE DU MICROTUBULE ET LA MATRICE DE NUCLEATION. | 6 |
| FIGURE 3 : LE FUSEAU METAPHASIQUE ET LES TYPES DE MICROTUBULES..... | 8 |
| FIGURE 4 : LA STRUCTURE DU CENTROSOME. | 10 |
| FIGURE 5 : LE CYCLE DU CENTROSOME..... | 12 |
| FIGURE 6 : LES VOIES DU NUCLEATION DES MICROTUBULES ET D'ASSEMBLAGE DU FUSEAU..... | 15 |
| FIGURE 7 : INFLUER SUR LA DYNAMIQUE ET LES LIENS ENTRE DES MICROTUBULES : OU ET POURQUOI ?..... | 21 |
| FIGURE 8 : LES MOTEURS MOLECULAIRES ET LA SEPARATION DES CENTROSOMES A L'ENTREE DE LA MITOSE. 33 | |
| FIGURE 9 : LES MOTEURS MOLECULAIRES ET L'INTEGRITE DES POLES DU FUSEAU. | 36 |
| FIGURE 10 : LA STRUCTURE DU KINETOCHORE..... | 40 |
| FIGURE 11 : LES MODES D'ATTACHEMENT KINETOCHORE-MICROTUBULES ET LE CPC. | 42 |
| FIGURE 12 : LA REGULATION DU POINT DE CONTROLE DE L'ASSEMBLAGE DU FUSEAU..... | 44 |
| FIGURE 13 : LE SYSTEME NERVEUX CENTRAL LARVAIRE ET LES TYPES DE NEUROBLASTES..... | 48 |
| FIGURE 14 : LA POLARITE APICO-BASALE DU NEUROBLASTE..... | 52 |
| FIGURE 15 : LE CYCLE DU CENTROSOME DANS LE NEUROBLASTE LARVAIRE. | 56 |
| FIGURE 16 : TBCE, UN AUTRE CANDIDAT PROMETTEUR..... | 85 |
| FIGURE 17 : VERS LA COMPREHENSION DU ROLE DES DOMAINES EHR1 ET EHR2 D'ENSCONSINE..... | 90 |

Liste des abréviations

ADN : Acide désoxyribonucléique
APC/C : Anaphase promoting complex/cyclosome
aPKC : atypical protein kinase C
ARN : Acide ribonucléique
ARNi : ARN interférence
ARNm : ARN messenger
ATP : Adénosine triphosphate
Bub : Budding uninhibited by Benomyl
CPC : Chromosome passenger complex
DDC : Dynein/dynactin complex
Fibres k : fibres kinétochoriennes
 γ -TuRC : γ -tubulin ring complex
 γ -TuSC : γ -tubulin small complex
GDP : Guanosine diphosphate
GFP : Green fluorescent protein
GMC : Ganglion mother cell
GTP : Guanosine triphosphate
INP : Intermediate neural precursor
Khc : Kinesin heavy chain
KO : Knockout
Mad : Mitotic arrest protein
MAP : Microtubule associated protein
MCAK : Mitotic centromere-associated kinesin
MCC : Mitotic checkpoint complex
MTOC : Microtubule organizing complex
Mud : Mushroom body defect
PACT : Pericentrin-AKAP-450 centrosomal-targeting
Par : Partitioning defective proteins
PCM : Pericentriolar materiel
PINS : Paterner of Inscuteable
PLP : Pericentrin-like protein
PON : Partner of Numb
PP1/PP2A : Protein phosphatase 1 et 2A
Ran : Ras-like nuclear protein
SAC : Spindle assembly checkpoint
SAF : Spindle assembly factor
SNC : Système nerveux central
TBCE : Tubulin specific chaperone E
TPX2 : Targeting protein for Xenopus kinesin-like protein 2

Introduction – L'assemblage du fuseau mitotique et le modèle du neuroblaste de Drosophile

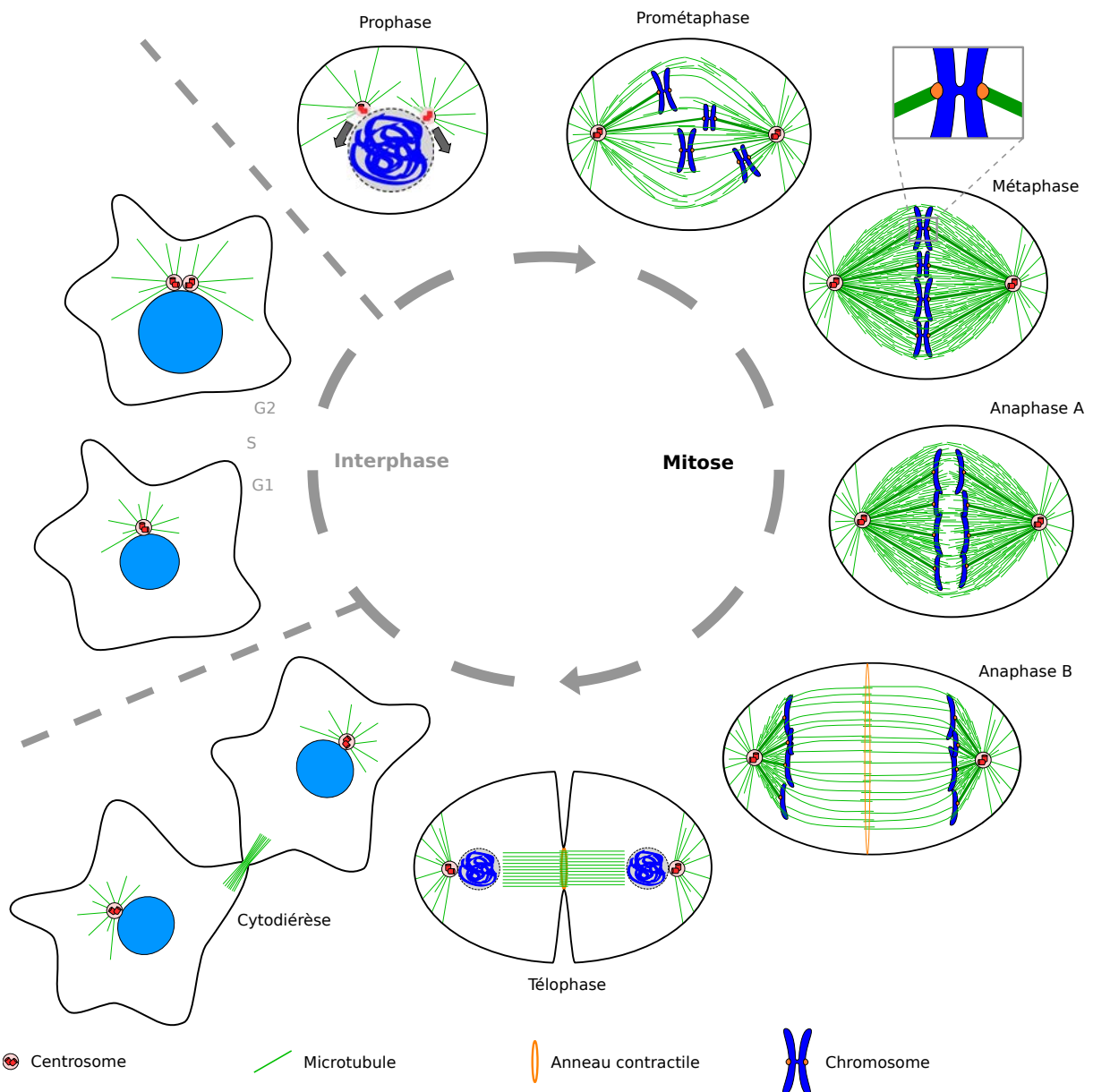


Figure 1 : Le cycle cellulaire.

Le cycle cellulaire est caractérisé par la succession de phases G1, S, G2 et M. Au cours de l'interphase, la cellule duplique l'intégralité de son génome (phase S) et son centrosome (des phases G1 à G2). Lors de la mitose, la cellule doit diviser équitablement son contenu génétique en deux lots de chromosomes qui sont hérités par chacune des deux cellules filles. Pour cela, elle met en place un réseau de microtubules hautement dynamique et finement régulé appelé le fuseau mitotique. Une fois les deux lots de chromosomes séparés aux pôles opposés de la cellule, un anneau contractile, composé d'actine et de myosine, se met en place à l'équateur de la cellule. S'en suit une contraction de cet anneau qui, à terme, individualise les deux cellules filles néoformées.

I - Généralités sur le cycle cellulaire

La division cellulaire est un processus essentiel au développement des organismes pluricellulaires, permettant à partir d'une cellule mère d'obtenir deux cellules filles génétiquement identiques entre elles. Ce processus est ponctué par deux principales étapes : la réplication intégrale du génome et la ségrégation équitable des deux lots de chromosomes dans les deux cellules filles. Ainsi, de manière conservée, les cellules se divisent selon le même schéma : l'ADN est répliqué au cours de la phase S et ségrégué en phase M ; entre ces deux phases s'intercalent les phases G1 et G2 de façon à constituer un cycle G1-S-G2-M. Les phases G1, S et G2 constituent l'interphase (figure 1).

Afin de garantir un contenu génétique strictement identique entre la cellule mère et les deux cellules filles, les différentes phases du cycle ainsi que leurs transitions sont hautement régulées. Des points de contrôle sont donc mis en place pour vérifier le bon déroulement de la réplication de l'ADN ainsi que la bonne ségrégation des chromatides sœurs.

La mitose, qui est l'étape de ségrégation des chromosomes, est communément découpée en cinq phases (figure 1) :

- La prophase est marquée par la condensation de l'ADN et la rupture de l'enveloppe nucléaire.
- La pro-métaphase correspond à la mise en place du fuseau mitotique. Les microtubules de ce dernier s'attachent aux kinétochores des chromosomes qui migrent vers « l'équateur » de la cellule : c'est la congression.
- La métaphase est caractérisée par l'alignement parfait des chromosomes sur la plaque métaphasique. Chaque chromosome doit être attaché de façon bipolaire pour que la cellule bascule dans l'étape suivante.
- L'anaphase est composée de deux phases : tout d'abord les chromatides sœurs migrent vers les pôles, tirées par les microtubules en dépolymérisation : c'est l'anaphase A. Puis les pôles du fuseau s'éloignent et le fuseau central se met en place entre les deux lots de chromatides (anaphase B). Ce fuseau central participe à la mise en place de l'anneau contractile composé d'actine et de myosine, dictant ainsi la position du sillon de division dans le plan de l'équateur de la cellule.
- La télophase marque la séparation physique des deux cellules. D'abord, l'anneau se contracte progressivement et partage en deux la cellule mère. Parallèlement, dans les deux nouvelles cellules, l'enveloppe nucléaire se reforme et les chromosomes se décondensent. Les deux cellules filles

restent attachées par le midbody (vestige du fuseau central) qui disparaît lors de la cytokinèse. Les deux cellules filles sont alors complètement séparées, c'est l'abscission.

II - Structure, assemblage et régulation du fuseau mitotique

A - Les microtubules, les origines de nucléation et les voies d'assemblage du fuseau mitotique

Chez les eucaryotes, la division cellulaire nécessite la mise en place d'un fuseau mitotique. Cette structure hautement dynamique et finement régulée est indispensable à une ségrégation équitable des chromatides sœurs dans les deux cellules filles. La fonction du fuseau mitotique est donc très conservée, cependant des différences architecturales majeures peuvent être observées à travers les espèces. Dans ce chapitre, je vais brièvement introduire le microtubule, les origines de nucléation et donc les différentes voies d'assemblage du fuseau mitotique.

1 - Le microtubule

a) Structure

Composant du cytosquelette de la cellule au même titre que l'actine, le microtubule est un polymère protéique qui, en mitose, est l'unité de base du fuseau. Du point de vue structural, le microtubule est un tube de 25 nm de diamètre composé de tubuline arrangée en protofilaments. Au niveau d'un protofilament, des hétérodimères d' α/β -tubuline sont associés dans une conformation « head-to-tail », ce qui confère aux protofilaments une polarité. Pour former un microtubule, dans la majorité des cas, 13 protofilaments sont associés latéralement suivant la même orientation, conférant au microtubule sa forme cylindrique. Il a cependant été montré que le nombre de protofilaments peut varier (Chrétien et al., 1992). La polarité des protofilaments, induite par la conformation orientée des hétérodimères de tubuline, résulte en une polarité du microtubule : l'extrémité (-), où l' α -tubuline est exposée, et l'extrémité (+) qui expose la β -tubuline. Chacune possède des propriétés dynamiques différentes (figure 2A).

b) Dynamique

Alors que l'extrémité (-) est peu dynamique et très stable, notamment car elle est protégée par des protéines comme la Patronine ou MCRS1 ((Goodwin and Vale, 2010; Meunier and Vernos, 2011) ; détaillé en II-B-2-c)), l'extrémité (+) subit alternativement des épisodes de polymérisation et de dépolymérisation rapide : c'est l'instabilité dynamique (Mitchison and Kirschner, 1984). Le

passage d'une phase de croissance à une phase de dépolymérisation est appelé catastrophe ; et l'inverse est le sauvetage (figure 2A).

Il existe une asymétrie au sein des hétérodimères de tubuline quant à leur faculté à lier le GTP. Alors que l' α -tubuline lie constitutivement sa molécule de GTP, la β -tubuline possède un site permettant l'échange entre GDP et GTP, appelé site E, qui sera localisé à l'extrémité (+) du microtubule (Mitchison, 1993). En solution, deux molécules de GTP sont liées au dimère de tubuline. Une fois inséré dans le microtubule, s'en suit une hydrolyse de GTP- β -tubuline en GDP- β -tubuline, ce qui déstabilise le microtubule (figure 2A). Cependant si le taux de polymérisation est plus rapide que l'hydrolyse du GTP, une coiffe GTP se forme à l'extrémité (+) du microtubule en croissance. Si la polymérisation ralentit, la coiffe GTP réduit jusqu'à disparaître, l'extrémité déstabilisée commence à dépolymériser : c'est ce qu'on appelle la catastrophe. Si la coiffe GTP se reforme sur un microtubule en phase de dépolymérisation, la tendance s'inverse et la croissance reprend : c'est le sauvetage.

c) Les récentes avancées

D'un point de vue structural, il avait été admis que la forme GTP-tubuline adopte une conformation plus droite qui favorise les contacts latéraux entre les protofilaments au moment de la fermeture. Et au contraire, la forme GDP est incompatible avec la formation de contacts latéraux, ce qui expliquerait l'impossibilité d'incorporation de cette forme (Wang and Nogales, 2005). Cependant des études récentes remettent en cause le modèle d'élongation exclusivement dépendant d'ajout de GTP-tubuline suivi de son hydrolyse, notamment par l'observation d'incorporation de GDP-tubuline (Valiron et al., 2010) et la présence de vestiges de GTP-tubuline dans le microtubule polymérisé (Dimitrov et al., 2008). Ceci indiquerait que la tubuline va acquérir une conformation droite seulement quand le protofilament lui-même se redresse au moment de la fermeture du tube, et ceci indépendamment du nucléotide chargé sur le site E de la β -tubuline (pour revue, (Valiron, 2011)).

d) La matrice de nucléation : le γ -TuSC et le γ -TuRC

Les microtubules peuvent polymériser spontanément *in vitro* à partir d'une solution d'hétérodimères α/β tubuline. Cependant, *in vivo*, ce processus requiert la présence d'un centre nucléateur. C'est un autre membre de la famille des tubulines qui possède ce rôle : la γ -tubuline. Un doublet de γ -tubuline s'associe avec GCP2 et GCP3 (Gamma tubulin Complex Proteins) appelées chez la Drosophile Dgrip84 et Dgrip91 respectivement (grip pour Gamma tubuline Ring complex Proteins) pour former le complexe γ -TuSC (Kollman et al., 2011; Raynaud-Messina and Merdes, 2007; Teixido-Travesa et al., 2012) (figure 2B).

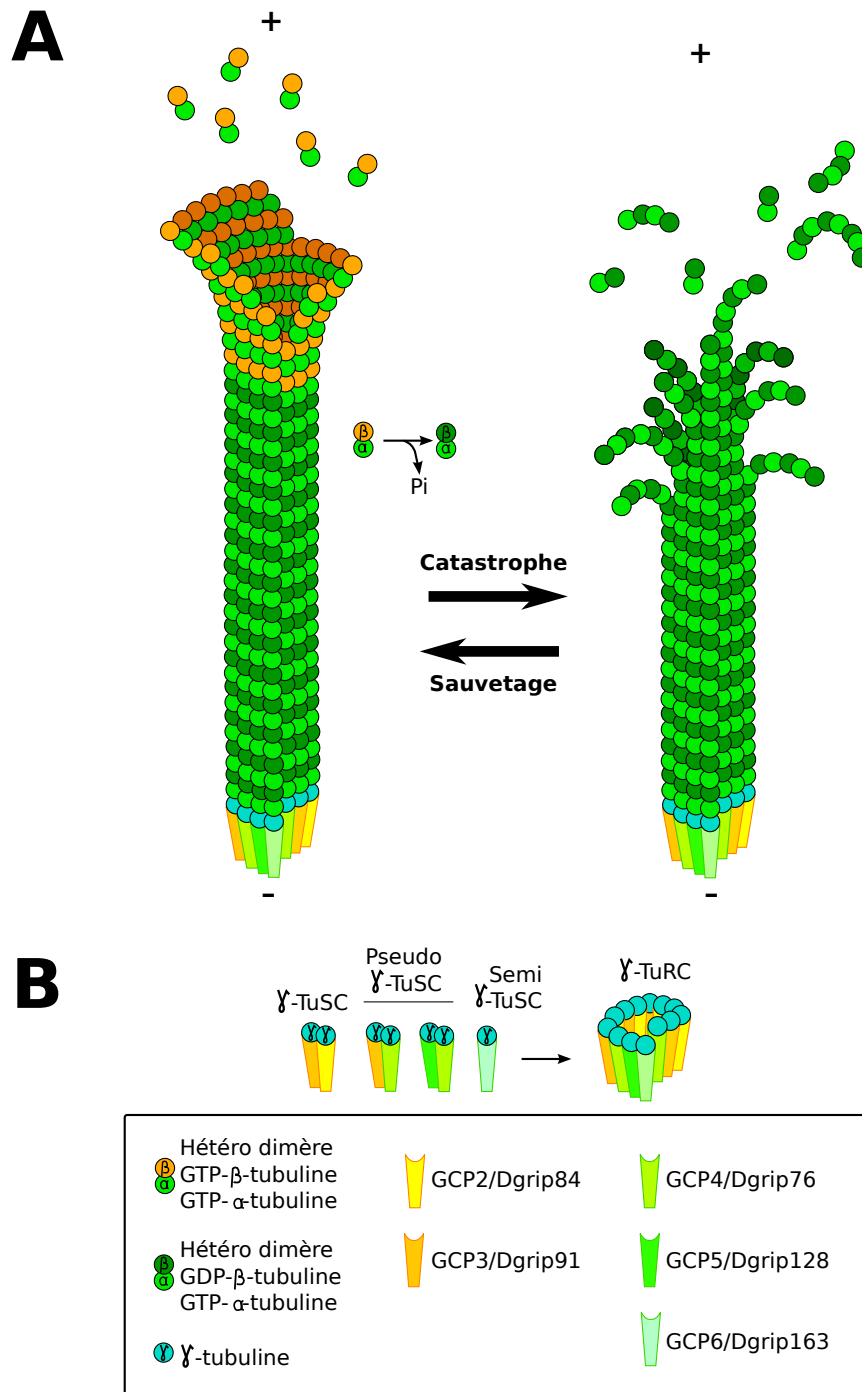


Figure 2 : La structure du microtubule et la matrice de nucléation.

A. Le microtubule est composé d'hétérodimères d' α/β -tubuline organisés en 13 protofilaments. En phase de polymérisation, une coiffe GTP constitue l'extrémité (+) dynamique des microtubules. Cette coiffe est composée d'hétérodimères α/β -tubuline chargés par une molécule GTP. Une fois dans la paroi, le GTP de la β -tubuline est hydrolysé. Le passage entre les phases de polymérisation et dépolymérisation est appelé catastrophe et l'inverse est le sauvetage. **B.** Un complexe, appelé le γ -TuRC constitue la matrice de nucléation au niveau de l'extrémité (-) du microtubule. Ce complexe est composé de plusieurs sous-complexes γ -TuSC (γ -tubuline, GCP2 et 3), de pseudo γ -TuSC et d'un semi γ -TuSC (où la γ -tubuline est associée aux protéines GCP4, 5 ou 6).

Grâce à de récentes études sur la structure du γ -TuSC et de GCP4 notamment, un nouveau modèle d'assemblage du γ -TuRC a été proposé. Le complexe γ -TuRC s'assemble à partir de plusieurs γ -TuSC et pseudo γ -TuSC où les protéines GCP4, 5 et 6 (respectivement Dgrip75, 128 et 163 chez la Drosophile) remplacent GCP2 et/ou GCP3 ; et d'un demi γ -TuSC composé d'une γ -tubuline et d'un des GCP4, 5 ou 6. Ceci correspond au nombre impair de protofilaments que contient classiquement un microtubule. Ainsi, 13 γ -tubulines s'associent latéralement, formant un anneau, et lient les α -tubulines « apparentes » aux extrémités (-) (Kollman et al., 2011) (figure 2).

La perte de fonction de Dgrip84/GCP2 chez la Drosophile entraîne une létalité plus ou moins précoce selon l'allèle et de sévères défauts d'assemblage du fuseau dans les neuroblastes et les spermatocytes. En permettant la maturation des centrosomes et le recrutement de la γ -tubuline aux pôles, le γ -TuSC est absolument essentiel à la viabilité (Colombie et al., 2006). A l'inverse, le γ -TuRC n'est pas requis pour la viabilité des Drosophiles. Les déplétions de Dgrip75, 128, et 163 (respectivement GCP4, 5, et 6) induisent des phénotypes mitotiques moins sévères que lors de la perte de fonction du γ -TuSC. De plus, le recrutement du γ -TuSC aux centrosomes n'est pas aboli après déplétion d'une ou plusieurs des protéines γ -TuRC-spécifiques (Vérollet et al., 2006). Le γ -TuSC semble donc capable seul de s'associer aux centrosomes et d'assurer une nucléation « basale ». Le γ -TuRC, assurerait quant à lui la localisation de la γ -tubuline dans le fuseau, renforçant la densité et l'architecture du fuseau, expliquant les phénotypes mineurs lors de sa déplétion.

D'autres protéines comme GCP-WD/NEDD1 et MOZART1, 2A et 2B sont également associées au γ -TuRC mais semblent avoir un rôle pour l'adressage sur certaines structures (centrosome ou fuseau) plutôt qu'un rôle purement fonctionnel pour la nucléation (Kollman et al., 2011; Raynaud-Messina and Merdes, 2007; Teixido-Travesa et al., 2012).

Enfin, des études plus récentes ont montré que les complexes de γ -tubuline, en plus d'un rôle dans la nucléation, seraient également impliqués dans la stabilité des microtubules. Ceci sera décrit en II – B – 2.

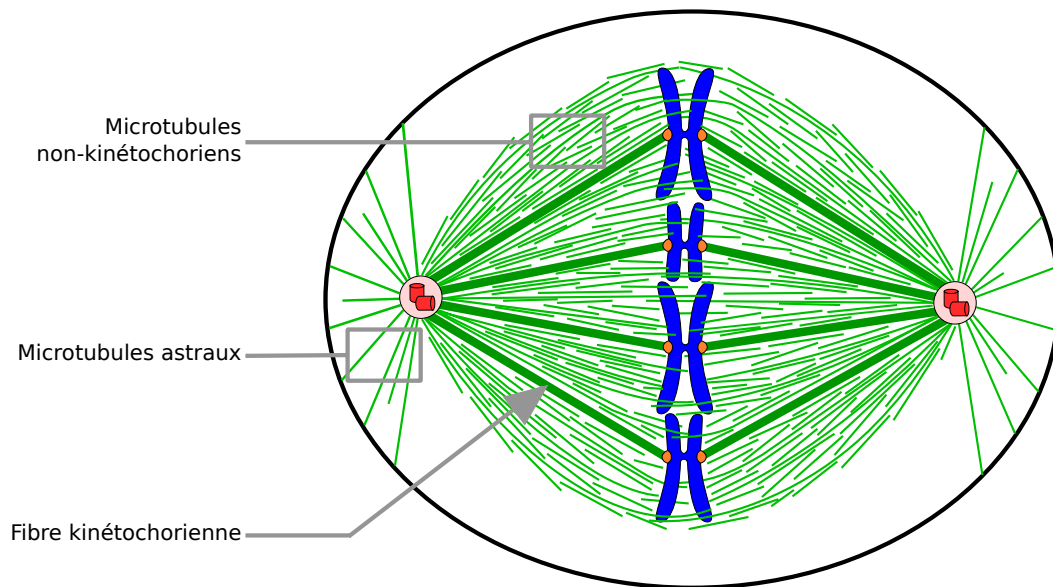


Figure 3 : Le fuseau métaphasique et les types de microtubules.

Trois grandes populations de microtubules composent le fuseau mitotique. Tout d'abord les fibres kinétochoriennes (fibres k) sont des faisceaux de microtubules particulièrement robustes qui joignent les kinétochores des chromatides sœurs à chacun des centrosomes. Les microtubules astraux émanent également des centrosomes et permettent leur ancrage au cortex cellulaire. Ce type de microtubule est impliqué dans le positionnement du fuseau et son orientation (dans le cas de cellules polarisées). Enfin, la troisième population de microtubules compose le fuseau au même titre que les fibres k. Ils sont appelés microtubules non-kinétochoriens et ont pour rôle de densifier le fuseau. Ils peuvent interagir avec les bras des chromosomes, ou entre eux de façon parallèle ou antiparallèle (microtubules interpolaires).

e) Les différentes populations de microtubules au sein du fuseau

Au sein d'un fuseau mitotique, on distingue trois types de microtubules : les microtubules kinétochoriens ou fibres kinétochoriennes (fibres k), les microtubules dits du fuseau (ou non kinétochoriens) et les microtubules astraux (figure 3).

La plupart des espèces présentent des chromosomes monocentriques, ce qui signifie qu'au niveau du centromère de chaque chromatide sœur se met en place une plateforme d'attachement des microtubules appelée kinétochore. Cependant, comme c'est le cas chez *C. elegans*, certaines espèces possèdent des chromosomes holocentriques, un kinétochore est assemblé tout au long des chromatides sœurs (Melters et al., 2012). Les fibres k font le lien entre les kinétochores et les pôles du fuseau. Elles ont la capacité de résister davantage au traitement par le froid ou à des concentrations faibles de drogues dépolymérisant les microtubules (Rieder, 1981) et ceci est dû à leur structure : ce sont des faisceaux (ou « bundles ») d'environ 12 (en prométaphase) à 30 microtubules (en anaphase) (McEwen et al., 1997). Cette stabilité, est renforcée par l'action de protéines de stabilisation qui pontent les microtubules entre eux comme HURP (Hepatoma UpRegulated Protein)(Yang and Fan, 2008) et également par la protection des extrémités (-) (MCRS1, (Petry and Vale, 2011)).

D'autres microtubules, en plus des fibres k, sont présents entre les deux pôles du fuseau : ce sont les microtubules non kinétochoriens. Ils sont capables de former un fuseau bipolaire sans kinétochore et sans centrosome (Heald et al., 1996), ils interagissent avec les bras des chromosomes (laissant penser à un rôle dans la congression (Cai et al., 2009)) ou entre eux, de façon antiparallèle à l'équateur du fuseau (microtubules interpolaires). La majorité de leurs extrémités (-) ne sont pas directement accrochées au centrosomes mais fréquemment associées au fibres k (Compton, 2000). Bien qu'aussi nombreux en mitose et beaucoup plus nombreux en méiose que les fibres k, leur rôle est moins clair. En 2009, Houghtaling et collaborateurs ont testé la contribution des microtubules non kinétochoriens en augmentant la concentration d'OP18/Stathmine qui séquestre la tubuline et agit directement sur la dynamique des microtubules dans des extrait de Xénope (Houghtaling et al., 2009). A une certaine concentration, seuls les microtubules non kinétochoriens sont touchés, ce qui influe sur la taille du fuseau. Il semble donc que cette classe de microtubules ait principalement un rôle structural, surtout pour les fuseaux les plus grands.

Enfin, les microtubules astraux émanent des centrosomes et leurs extrémités (+) sondent le cytoplasme dans la direction opposée par rapport aux microtubules du fuseau pour interagir avec le cortex de la cellule. Ils sont impliqués dans l'ancrage des pôles du fuseau et donc à l'orientation de la division de la cellule ((Lu and Johnston, 2013) ; décrit plus loin).

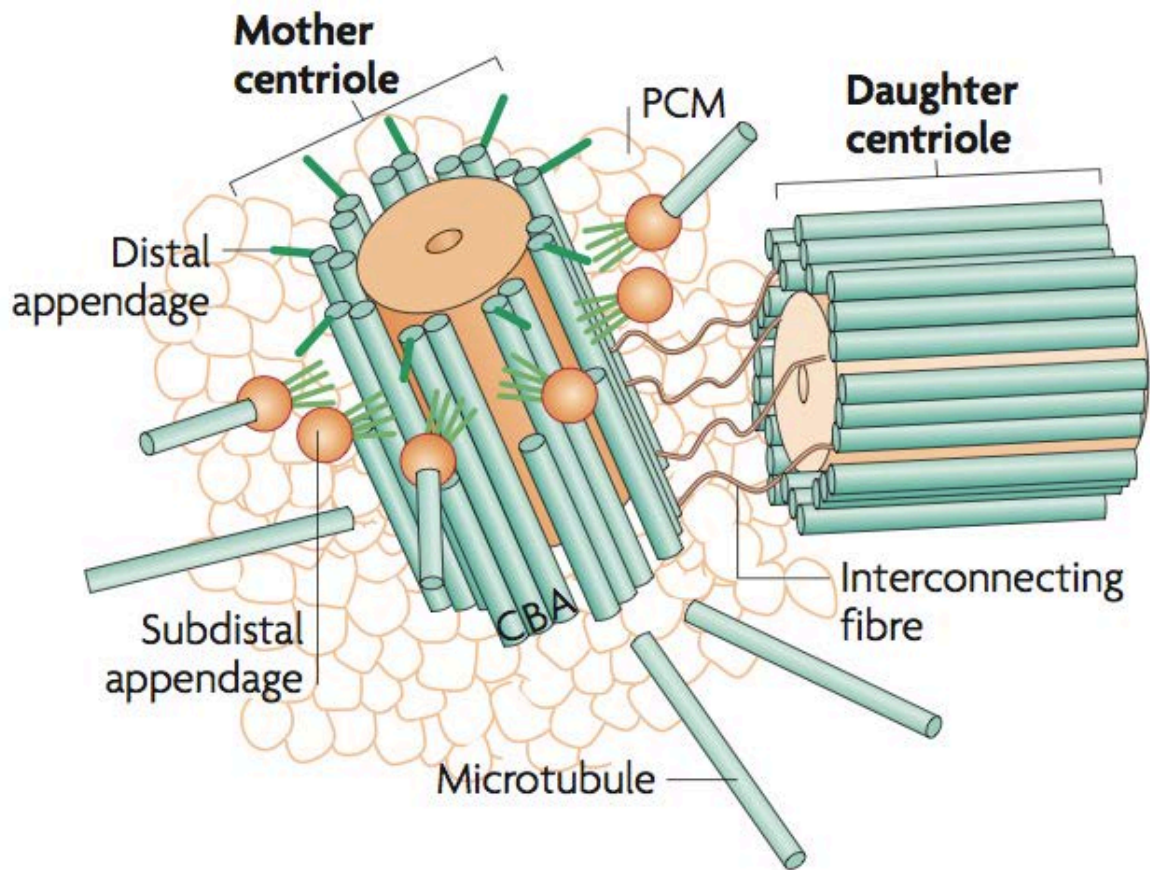


Figure 4 : La structure du centrosome.

Le centrosome est composé de deux centrioles orthogonaux l'un à l'autre, qui sont eux mêmes constitués de neuf triples de microtubules très stables (notés A, B et C de l'intérieur vers l'extérieur). Ces deux centrioles sont reliés entre eux par des fibres d'interconnexion (Interconnecting fibre). Le centriole père (Mother centriole) possède des appendices distaux et subdistaux (Distal and Subdistal appendages) qui retiennent les microtubules et pourraient être importantes pour l'ancrage à la membrane lors de la formation de cils. Enfin, autour des centrioles s'assemble une matrice appelée PCM (PeriCentriolar Material) qui est l'élément clé permettant la nucléation des microtubules. Schéma issu de (Bettencourt-Dias and Glover, 2007).

2 - Le centrosome et le modèle de « recherche et capture »

Bien que non nécessaire pour l'établissement d'un fuseau, notamment en méiose mais également chez les plantes, le centrosome constitue une source majeure de microtubules. Avec un équivalent fonctionnel chez la levure appelé SPB (Spindle Pole Body), le centrosome est le majeur MTOC (MicroTubule-Organizing Center, centre organisateur de microtubules) des cellules somatiques animales, avec pour principale activité la nucléation de microtubules en interphase et en mitose.

a) Structure

Le centrosome est composé de deux centrioles, orthogonaux l'un par rapport à l'autre, d'environ 500 nm de long, et chacun formé de neuf triplets de microtubules très stables arrangés en cylindre. Au cours de l'évolution, la structure du centriole a divergé, ainsi chez la *Drosophile* le centriole est composé de neuf doublets et chez *Caenorhabditis elegans*, de neuf microtubules uniques. Les deux centrioles, liés par leur région proximale, sont entourés d'une matrice dense aux électrons appelée le PCM (PeriCentriolar Material) (Bettencourt-Dias and Glover, 2007) (figure 4). Les centrioles sont indispensables pour éviter la dispersion du PCM et donc favoriser le pouvoir de nucléation des centrosomes (Basto et al., 2006).

Au cours du cycle de la cellule, et donc du centrosome, la composition du PCM évolue. Grâce à de nombreuses études protéomiques et/ou fonctionnelles à grande échelle, de nombreux composants et régulateurs des centrosomes ont été identifiés (Bettencourt-Dias et al., 2004; Dobbelaere et al., 2008; Goshima et al., 2007; Jakobsen et al., 2011; Muller et al., 2010) expliquant aussi les différences d'activités entre les deux centrosomes d'une même cellule, selon le recrutement de certaines protéines à un moment donné ((Piel et al., 2000) ; détaillé plus loin pour le cas du neuroblaste de *Drosophile*).

b) Cycle

En sortie de mitose, chacune des cellules filles a hérité d'un des deux centrosomes, qui devra être dupliqué au cours du cycle de la cellule pour assurer son rôle lors de la prochaine division. Ainsi, le centrosome a un cycle conjointement lié à celui de la cellule. Chez l'Homme, en fin de mitose/début de G1, la phase de désengagement correspond au moment où les deux centrioles perdent leur orientation orthogonale. Puis en fin de phase G1, les centrioles se dupliquent. Ces précentrioles subissent une phase d'élongation jusqu'en fin de phase G2. Finalement, à la transition G2/M, les deux centrosomes se séparent et maturent, recrutant le PCM ce qui renforce considérablement leur pouvoir de nucléation (Bettencourt-Dias and Glover, 2007) (figure 5).

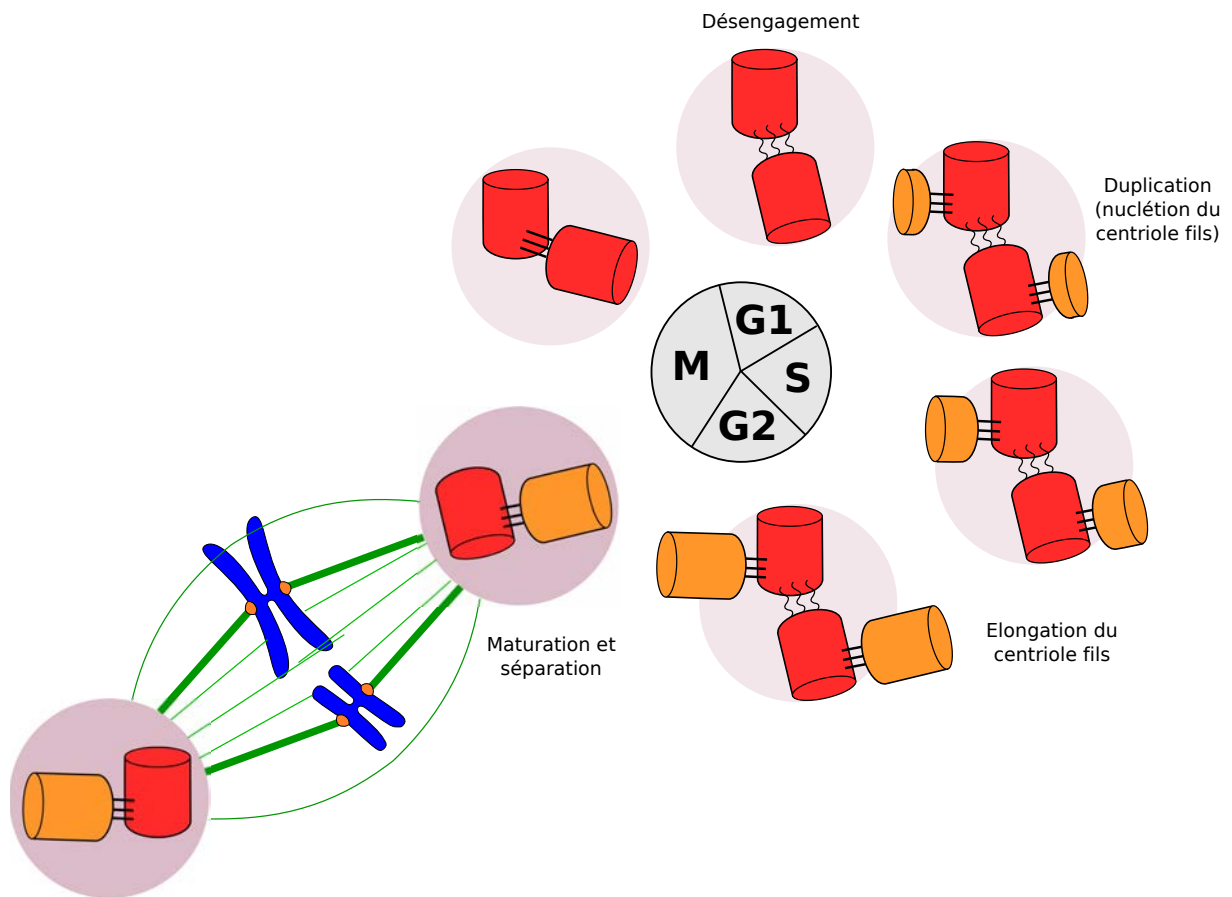


Figure 5 : Le cycle du centrosome.

Le cycle du centrosome est étroitement lié à celui de la cellule. Chez l'Homme, en fin de mitose/début de phase G1, les centrioles perdent leur orientation orthogonale : c'est le désengagement. En fin de phase G1/début de phase S commence la duplication : le centriole fils (orange) nucléé de façon orthogonale au centriole père. Ensuite, jusqu'en fin de phase G2 (voire début de phase G1 du cycle suivant), l'élongation du centriole fils a lieu. Pour finir, à la transition G2/M, les centrosomes mûrent et se séparent. Ils recrutent alors le PCM (violet) et augmentent ainsi leur pouvoir de nucléation, indispensable à l'assemblage du fuseau mitotique.

Cependant, comme pour la structure qui a divergé au cours de l'évolution, le cycle du centrosome présente également des variations d'une espèce à l'autre, comme chez la *Drosophile* où la séparation précède la duplication (Januschke et al., 2011)

c) Modèle de « recherche et capture »

Après les premières observations de l'instabilité dynamique des microtubules, Kirschner et Mitchison (Kirschner and Mitchison, 1986) proposent une stabilisation sélective des microtubules captant un kinétochore. En effet, il a été estimé quelques années plus tard que l'instabilité dynamique des microtubules semble être la façon la plus efficace (et donc la plus rapide) pour sonder l'espace de la cellule à la recherche des kinétochores de chromatides sœurs (Holy and Liebler, 1994).

Les centrosomes, au niveau du PCM, vont recruter la γ -tubuline sous la forme du complexe γ -TuRC. Ces complexes servent de matrice aux microtubules nucléant en très grand nombre à partir des centrosomes, qui regroupent donc les extrémités (-) des microtubules (Raynaud-Messina and Merdes, 2007). De part la séparation des centrosomes et leur localisation aux pôles opposés de la cellule, les nombreux microtubules, qui vont aléatoirement s'attacher à un kinétochore, vont contraindre le kinétochore libre à s'orienter face au second centrosome de la cellule. Ce processus facilite la capture de la seconde chromatide sœur et contribue à la bipolarité du fuseau (Gadde and Heald, 2004) (figure 6A).

Cependant, deux arguments majeurs forcent à penser que cette voie d'assemblage n'est pas absolument requise mais permet simplement une meilleure efficacité de l'assemblage du fuseau. Premièrement, l'ablation (Khodjakov et al., 2000) ou l'absence des centrosomes (Basto et al., 2006) ne compromettent pas l'assemblage du fuseau voire le développement d'un organisme (dans le deuxième cas, chez la *Drosophile*). Deuxièmement, des simulations ont montré que le simple phénomène de « recherche et capture » induirait un temps d'assemblage de fuseau démesuré par rapport à la réalité physiologique (Wollman et al., 2005). Ceci implique l'existence de « biais moléculaires » qui faciliteraient la formation d'un fuseau, comme le gradient de Ran (partie II-A-3 et figure 6B).

Malgré le fait que les centrosomes ne soient pas requis pour toutes les divisions, ils apparaissent cependant essentiels chez les vertébrés (Bettencourt-Dias, 2013).

d) Orientation du fuseau mitotique et le positionnement des centrosomes

Les centrosomes définissent donc les pôles du fuseau et concentrent les extrémités (-) des microtubules, aussi bien ceux du fuseau à proprement parler, que les microtubules astraux. Ces

microtubules asexés vont permettre l'ancrage du fuseau à la membrane cellulaire et donc définir l'orientation de celui-ci. Ce processus est donc étroitement lié à l'établissement et le maintien d'un axe de polarité tout au long de la mitose. De nombreuses études chez *C. elegans*, la Drosophile, et les vertébrés comme le poulet et la souris, ont permis d'identifier une localisation corticale polarisée de déterminants d'identité cellulaire qui constituent des signaux corticaux qui vont dicter l'orientation du fuseau mitotique ((Knoblich, 2010) ; détaillé en III-A-2). De façon intéressante, ces différents signaux corticaux, quelque soit l'organisme et le type cellulaire, convergent tous vers le module protéique NuMA / complexe Dynéine-Dynactine qui semble être l'élément central et nécessaire à l'ancrage des microtubules asexés au cortex cellulaire (Morin and Bellaïche, 2011). Ceci va avoir une importance primordiale dans le cas des divisions asymétriques où des déterminants d'identité cellulaire vont ségréger asymétriquement dans les deux cellules filles, comme c'est le cas pour le neuroblaste de Drosophile qui sera détaillé en III.

e) Implications dans les cancers

Comme l'avait décrit Theodor Boveri au début du siècle dernier, des anomalies du nombre de centrosomes sont fortement associées au cancer. Depuis il a été montré que pour différentes raisons (sur-duplication, fusion de cellules, assemblage *de novo*, et défaut de cytokinèse (Nigg, 2006)), des centrosomes surnuméraires peuvent apparaître et engendrer l'aneuploïdie. En effet, même si les cellules sont capables de former des fuseaux bipolaires par le regroupement des extra-centrosomes, ceci implique tout de même la formation de fuseaux multipolaires de « transition », et donc d'attachements mérotéliques (Rome et al., 2010; Vitre and Cleveland, 2012) moins bien détectés par le point de contrôle de l'assemblage du fuseau et le CPC (*Spindle Assembly Checkpoint* = SAC et Chromosome Passenger Complex ; décrit en II-C)

De part leur implication dans l'orientation du fuseau et dans le maintien de la stabilité génomique, le dysfonctionnement des centrosomes peut être doublement impliqué dans des processus de cancer.

f) Le centrosome en interphase et phylogénie

Pour les cellules en interphase ou différenciées, le réseau de microtubules organisé par les centrosomes influe sur la forme, la polarité et la motilité des cellules. Il est important de noter que le positionnement des centrosomes a un rôle dans la migration cellulaire (fibroblastes ou neurones), la formation de cils primaires ou multiples ou encore le trafic de vésicules (Tang and Marshall, 2012). Enfin, les centrosomes vont également être à l'origine de la formation des cils primaires, requis autant pour la motilité que pour les voies de signalisation Sonic Hedgehog, Wnt ou PDGF (Nigg and Raff, 2009).

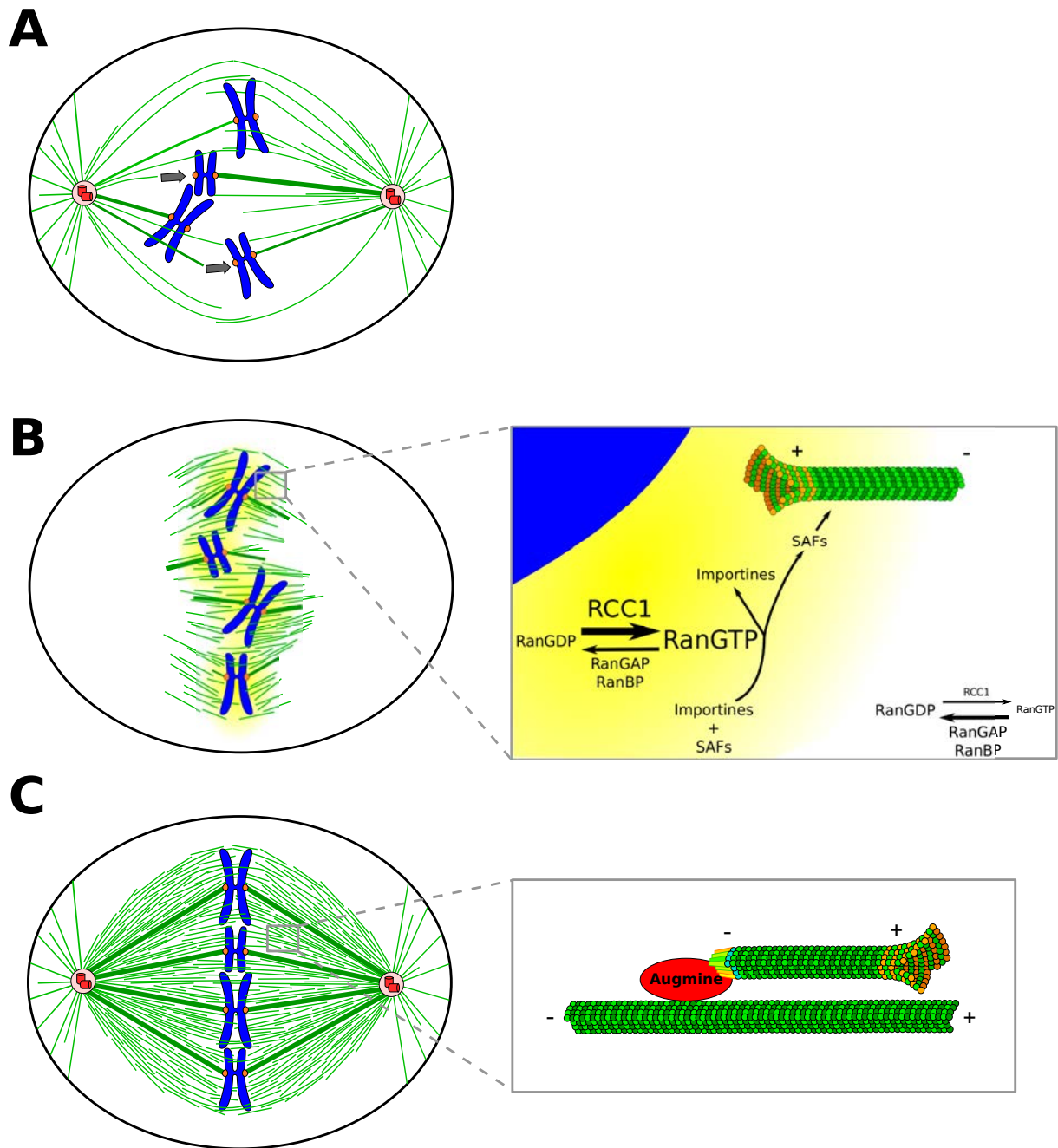


Figure 6 : Les voies du nucléation des microtubules et d'assemblage du fuseau.

A. Le modèle « Recherche et capture ». Les microtubules émanant des centrosomes sondent l'intérieur de la cellule jusqu'à rencontrer un kinétochore. Il résulte de cette liaison une orientation du chromosome favorable à la capture du second kinétochore par les microtubules nucléés par le second centrosome (symbolisée par les flèches grises). **B.** Le modèle d' « auto-assemblage ». Mis en évidence dans un contexte acentrosomal, cette voie d'assemblage repose sur l'existence d'un gradient Ran (jaune) autour des chromosomes. Dans le proche voisinage de la chromatine, RCC1 permet de charger Ran d'une molécule de GTP. RanGTP va permettre la libération des facteurs d'assemblage du fuseau (SAFs pour Spinde Assembly Factors) retenus par les importines α/β . Ces SAFs favorisent la polymérisation et la stabilité des microtubules autour de la chromatine. **C.** La nucléation microtubule-dépendante. Médiée par le complexe Augmine (rouge) qui recrute le γ -TuRC, cette voie de nucléation permet de créer des microtubules parallèles à ceux déjà existants, augmentant la densité en microtubules du fuseau.

Cependant, malgré des rôles incontestables en mitose comme en interphase, les centrosomes sont absents d'un certain nombre d'espèces. De plus, la présence des centrioles est corrélée avec la présence de flagelles ou cils (Bettencourt-Dias, 2013). Il semble donc que ce soit la présence de ces structures qui provoque la pression de sélection des centrioles chez les espèces et non le rôle dans l'assemblage du fuseau.

3 - La chromatine et le modèle d'auto-assemblage

Les centrosomes étant absents en méiose chez de nombreuses espèces animales et quelques fois complètement inexistantes chez certaines espèces (Bettencourt-Dias, 2013), d'autres sources de microtubules sont nécessaires à la formation du fuseau bipolaire. En 1996, Heald et collaborateurs ont montré qu'un fuseau bipolaire s'assemble autour de billes magnétiques recouvertes d'ADN plasmidique (sans région centromérique et donc sans kinétochore), au contact d'extrait d'embryon de Xénope (dépourvu de centrosomes) (Heald et al., 1996). Comme dans le cas de la mitose chez les plantes ou la méiose chez une grande partie des espèces animales, des microtubules sont nucléés dans le proche voisinage de l'ADN, ce qui forme un amas d'ADN et microtubules. Les pôles du fuseau sont finalement formés, par l'action de la Dynéine notamment.

Il a été montré depuis qu'un gradient de RanGTP (Ran pour RAs-like Nuclear Protein) autour de la chromatine mitotique permet cette nucléation (figure 6B). La protéine RCC1 (Regulator of Chromosome Condensation 1) est associée à la chromatine et est la GEF (Guanine Exchange Factor) qui va permettre le chargement d'une molécule de GTP sur la protéine Ran. Comme pour les billes magnétiques recouvertes d'ADN, des billes uniquement recouvertes de RCC1 sont capables de former des fuseaux bipolaires (Halpin et al., 2011). Un autre régulateur est RanGAP, qui va promouvoir l'hydrolyse du GTP associé à Ran. Cette hydrolyse est amplifiée par un cofacteur de RanGAP appelé RanBP (figure 6B, encadré). La surexpression de RanBP ou RCC1 vont toutes deux induire des phénotypes inverses sur la formation de fuseaux acentrosomaux à partir d'extrait de Xénope (Kalab et al., 1999). L'extension du gradient RanGTP (par augmentation de la concentration de RCC1 ou l'expression d'une version dominant-négative de RanG19V qui ne subit pas l'hydrolyse du GTP) va augmenter le nombre de MTOC non associés au fuseau. A l'inverse, la diminution du gradient RanGTP (avec un dominant négatif RanT24N où le GTP ne peut pas être chargé, ou par surexpression de RanBP) va réduire la densité de microtubules autour des chromosomes. Ceci a été confirmé plus tard en cellules humaines (Kalab et al., 2006) : l'augmentation du gradient de RanGTP par un dominant négatif RanQ69L, entraîne une augmentation du nombre d'asters de microtubules.

Ce gradient de RanGTP induit la nucléation de microtubules par la libération de facteurs d'assemblage du fuseau (SAF pour Spindle Assembly Factors) retenus par les importines α/β (figure

6B, encadré). Des facteurs comme TPX2 (Targeting Protein for Xklp2) (Gruss et al., 2001) ou NuMA (Nachury et al., 2001; Wiese, 2001) sont relargués des importines α/β sous le contrôle du gradient de RanGTP, à proximité de la chromatine. Cependant, les voies d'action de TPX2 et sa régulation par les importines ne sont pas claires : quand TPX2 est déplété, il n'y a plus de nucléation de microtubules dépendante de RanGTP (Gruss et al., 2001) mais une autre étude a montré que TPX2 est capable d'induire à la fois nucléation et « bundling » de microtubules et que la séquestration par les importines ne bloquerait que la nucléation (Schatz et al., 2003). D'autres MAPs (Microtubules Associated Proteins) sont libérées des importines par le gradient RanGTP : Maskin/TACC/D-TACC (Transforming Acidic Coiled Coil) qui stimule la croissance des microtubules aux centrosomes (Albee et al., 2006), NuSAP qui forme des bundles de microtubules et contribue aux interactions microtubules-chromatine (Ribbeck et al., 2006), HURP (Sillje et al., 2006)...

Plus récemment, il a été montré que certains SAFs, dont HURP et NuSAP, sont des cibles de l'Anaphase Promoting Complex/Cyclosome (APC/C) uniquement après leur libération des importines par le gradient RanGTP (Song and Rape, 2010). Ceci ajoute une nouvelle dimension à la régulation des facteurs participant à l'assemblage du fuseau.

Enfin, le Chromosome Passenger Complex (CPC), grâce à l'activité kinase d'Aurora B, inhiberait OP18/Stathmine et la kinesine-13 MCAK à proximité de la chromatine, ce qui augmente la stabilité des microtubules dans cette région (Gadea and Ruderman, 2006; Ohi et al., 2004).

4 - La nucléation à partir des kinétochores

Deux principales études ont prouvé par vidéomicroscopie une nucléation des fibres k par les kinétochores, qui n'était que jusque là pressentie. Des cellules traitées au Monastrol, molécule qui inhibe Eg5 et induit la formation de fuseaux monopolaires par regroupement des centrosomes, présentent des bundles de microtubules, nucléés à partir des kinétochores. Ces bundles sont capables de former des boucles sous le contrôle de NuMA. Lorsque le Monastrol est retiré du milieu de culture des cellules et que les centrosomes se séparent, ces boucles sont incorporées dans le fuseau. Ce phénomène a été vérifié par vidéomicroscopie dans des cellules non traitées (Khodjakov et al., 2003). De plus, une autre étude a montré en cellules S2 qu'une partie des fibres k est nucléée à partir des kinétochores distaux de chromosomes mono-orientés. Elles sont alors capturées par les microtubules du second centrosome. Puis, par l'action de la Dynéine, les extrémités (-) de ces fibres k sont tirées vers le centrosome (Maiato et al., 2004b).

Comme pour la nucléation autour de la chromatine mitotique, la nucléation mise en place spécifiquement au niveau des kinétochores dépend du gradient de RanGTP. RanGTP et RanGAP1

(facteur induisant l'hydrolyse du GTP) sont localisés sur les kinétochores pendant et après traitement au Nocodazole (Torosantucci et al., 2008). Il est intéressant de noter que la nucléation par les kinétochores est stimulée quand les centrosomes sont altérés (ARNi contre Plk1).

Une étude a également montré que TPX2 est impliqué dans la nucléation via les kinétochores par la voie Ran mais sa déplétion n'empêche pas pour autant la capture des chromosomes par les microtubules nucléés par les centrosomes (Tulu et al., 2006). Dans cette même étude, les auteurs montrent également que la déplétion de la Survivine (membre du CPC), entraîne une forte réduction de la densité des microtubules, et notamment des fibres k autour de la chromatine (Tulu et al., 2006). Ce phénotype est sauvé par la déplétion de MCAK dont l'un des rôles est de déstabiliser les attachements incorrects entre microtubules et kinétochores (Voir partie II-C-2). Une autre étude fait également le lien entre le gradient de Ran et le CPC dans la nucléation des microtubules par les kinétochores. En effet, en l'absence de gradient RanGTP localisé (et donc une libération localisée des SAFs) par surexpression de deux dominants négatifs, d'abord T24N qui va bloquer le chargement du GTP puis G69L qui est une forme ne permettant pas l'hydrolyse, un fuseau bipolaire peut se former autour de l'ADN issu du sperme de Xénope (contenant des kinétochores) mais pas autour de billes couvertes d'ADN plasmidique. Ceci est dépendant d'INCENP, un autre membre du CPC (Maresca et al., 2009). Ces travaux montrent donc un lien évident entre le gradient de RanGTP et le CPC dans la nucléation localisée autour des chromosomes et notamment au niveau des kinétochores.

La plupart de ces études ont été menées sur des extraits méiotiques de Xénope. En cellule HeLa, dans un modèle de mitose sans réplication du génome (Mitosis with Unreplicated Genome, MUG) la chromatine se retrouve rapidement exclue de la région centrale du fuseau où il ne reste que les régions centromériques (et donc les kinétochores). Ceci a permis de montrer que RCC1 est bien présent sur la chromatine, mais pas aux kinétochores. Le fuseau s'assemble dans ce cas à l'extérieur du gradient RanGTP. Cependant, en déplaçant Nuf2, membre du complexe Ndc80 requis pour l'attachement stable de microtubules aux kinétochores, l'assemblage d'un fuseau bipolaire n'est plus possible (O'Connell et al., 2009). En 2009 également, Bucciarelli et collaborateurs ont montré chez la Drosophile que Dgt6 (membre du complexe Augmin, voir ci-après) interagit avec plusieurs membres du complexe Ndc80, Msps/XMAP215 et la γ -tubuline et est responsable de leur localisation sur les fibres k et la formation de ces fibres elles-mêmes (Bucciarelli et al., 2009). Ceci place la nucléation via les kinétochores au centre de la voie de nucléation dépendante de la chromatine dans les cellules somatiques, et ceci de façon RanGTP indépendante.

5 - La nucléation microtubule-dépendante ou ramification

C'est plus récemment, en 2006, que cette voie de nucléation a été démontrée en mitose, dans des cellules S2 de Drosophiles (Mahoney et al., 2006). Deux arguments sont mis en avant : tout d'abord la γ -tubuline est fortement localisée aux centrosomes mais décore également le fuseau, une localisation renforcée en l'absence de centrosome (ARNi contre la Centrosomine, Cnn). Ceci implique une nucléation des microtubules à l'intérieur du fuseau. De plus, par le suivi en métaphase de comètes EB1::GFP (Green Fluorescent Protein) marquant les extrémités (+) des microtubules en croissance, les auteurs ont observé qu'en l'absence de centrosome, une nucléation à partir des pôles et orientée vers l'ADN a bien lieu. Cependant, en déplaçant la γ -tubuline, une nucléation à partir de pseudo-pôles est observée mais elle est moins bien organisée que lors de la déplétion de Cnn. Ceci indiquerait donc qu'un autre facteur, alors inconnu, doit contribuer à la nucléation microtubule-dépendante, en plus de la γ -tubuline. C'est lors d'un crible par ARNi ciblant tout le génome en cellules S2 que ce facteur a été identifié (Goshima et al., 2007). Quatre protéines ont été identifiées suite à une perte de fonction qui diminue la γ -tubuline dans le fuseau. Elles sont appelées Dgt3 à 6 par rapport à leur phénotype « dim γ -tubulin ». Les protéines tagguées GFP Dgt4, 5 et 6 décoorent uniformément le fuseau. En 2008, Goshima montre que les protéines Dgt2 à Dgt6 forment un complexe qui s'associe aux microtubules et sera baptisé Augmine (Goshima et al., 2008). Il montre que ce complexe est important pour la génération de microtubules dans le fuseau avec un rôle dans la formation des fibres k et l'alignement des chromosomes. Finalement, les derniers membres du complexe (Dgt7 à 9, respectivement *msd5*, *wac* et *msd1*) sont publiés l'année suivante. L'Augmine est donc un complexe de 8 protéines, conservé chez l'Homme (Uehara et al., 2009) (figure 6C). Chez l'Homme, l'Augmine est impliquée dans la tension des kinétochores métaphasiques, dans l'établissement du fuseau central en cytokinèse ; et ceci grâce à son interaction avec le γ -TuRC. Le modèle avancé est donc que l'Augmine se lie aux microtubules préexistants et permet le recrutement du γ -TuRC pour nucléer de nouveaux microtubules.

Le rôle du complexe Augmine est conservé à travers les espèces et est également impliqué en méiose. Par une étude en extrait de Xénope, il a été montré que la nucléation RanGTP-dépendante autour des chromosomes n'est pas suffisante à l'établissement d'un fuseau bipolaire (Petry et al., 2011). Sans Augmine, la densité de microtubules dans le fuseau est réduite, la proportion de fuseaux multipolaires est augmentée et le nombre de comètes de EB1::GFP dans le fuseau est réduit par rapport au contrôle.

Le modèle de fonctionnement de cette voie de nucléation a été confirmé plus tard par microscopie TIRF (Petry et al., 2013). De nouveaux microtubules sont capables de nucléer à partir de

la paroi de microtubules déjà existants, dans une la même direction et avec un angle généralement inférieur à 30°. Les auteurs ont également montré que cette nucléation est stimulée par RanGTP et TPX2.

Cette nucléation semble donc doublement impliquée dans la mise en place du fuseau mitotique : d'abord en augmentant la masse de microtubules du fuseau et donc la cinétique d'assemblage, puis de part les propriétés des ramifications (direction et angle) ils vont participer à la bipolarisation du fuseau en favorisant les régions de chevauchement de microtubules antiparallèles. Ceci expliquerait également les défauts d'assemblage du fuseau central lors de la cytokinèse en cellules humaines lors de la déplétion d'Augmine (Uehara et al., 2009). Lors de l'établissement de fuseau métaphasique en présence de centrosomes chez le Xénope (Petry et al., 2011), en cellules humaines (Uehara et al., 2009) ou en cellules S2 de Drosophile (Goshima et al., 2008; Meireles et al., 2009), l'Augmine n'est pas indispensable mais accélère le phénomène. En effet, la perte de fonction du gène *wac*, correspondant à *Dgt8*, entraîne des phénotypes importants en culture de cellules mais cette protéine n'est pas requise pour la viabilité. Les femelles sont cependant stériles car malgré un fuseau acentrosomal robuste, des défauts d'alignement des chromosomes sont fréquents (Meireles et al., 2009). Pour conclure, c'est surtout son rôle dans la génération de zone de chevauchement de microtubules antiparallèles qui va induire le plus important phénotype mitotique, une fois la transition métaphase/anaphase dépassée.

B - Les protéines régulatrices

Certaines protéines ont déjà été citées précédemment mais il existe un grand nombre de protéines qui régulent l'assemblage du fuseau mitotique. De nombreuses études haut-débit avec des approches protéomiques, génétiques ou combinées ont permis d'identifier un large nombre des composants du centrosome et du PCM, des MAPs et des protéines ayant un rôle direct ou indirect avec l'assemblage du fuseau (Bettencourt-Dias et al., 2004; Dobbelaere et al., 2008; Goshima et al., 2007; Hughes et al., 2008; Jakobsen et al., 2011; Malik et al., 2009; Muller et al., 2010; Neumann et al., 2010; Nousiainen et al., 2006; Sauer et al., 2005; Torres et al., 2011). Je détaillerai dans cette partie dans quelles régions du fuseau et pourquoi ces protéines régulatrices sont importantes. Suivront quelques exemples de protéines favorisant ou défavorisant la stabilité des microtubules, l'implication des modifications post-traductionnelles de la tubuline et enfin l'implication des moteurs moléculaires dans l'assemblage d'un fuseau bipolaire.

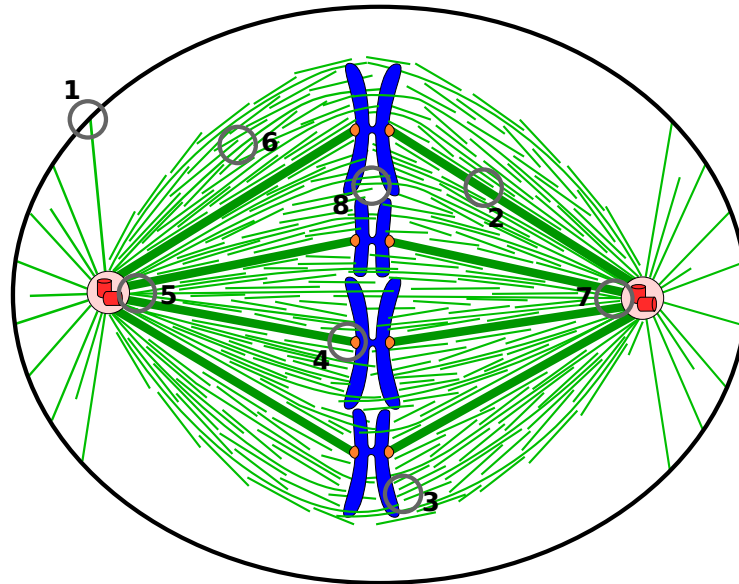


Figure 7 : Influencer la dynamique et les liens entre des microtubules : où et pourquoi ?

Réguler la dynamique et la stabilité des microtubules est crucial pour l'établissement du fuseau. Tout d'abord, la stabilité des microtubules aux extrémités (+) est indispensable à l'ancrage du fuseau à la membrane (1) et aux attachements kinétochore-microtubules (4). Stabiliser les microtubules en faisceaux permet la formation des fibres k (2). L'intégrité des pôles nécessite l'action de moteurs moléculaires et de protéines de pontage (5) entre les extrémités (-) des microtubules, qui peuvent être protégées ou à l'inverse sujettes à la dépolymérisation (7), ceci dans le but de maintenir la longueur du fuseau. D'autres moteurs vont participer au maintien de la bipolarité du fuseau, particulièrement dans la région centrale du fuseau, zone de chevauchement de microtubules antiparallèles (8). Pour finir, influencer de manière générale sur la dynamique des microtubules va permettre de densifier le fuseau, le rendre ainsi plus robuste (6) et maintenir sa taille malgré l'instabilité dynamique inhérente aux microtubules.

1 - Où et pourquoi ?

Afin d'organiser les nombreux microtubules nucléés à partir des différents centres organisateurs des microtubules décrits précédemment (centrosomes et chromatine) en un fuseau bipolaire, dynamique et fonctionnel, de nombreuses protéines entrent en jeu. Les activités de ces protéines sont variées et leurs localisations sont étroitement associées à leurs activités et leurs rôles sur l'aspect global du fuseau (figure 7).

Ainsi, de façon localisée, certaines protéines vont favoriser ou non les attachements des microtubules aux kinétochores (détaillé dans la partie II-C), au cortex, ou encore aux bras des chromosomes lors de la congression. D'autres protéines doivent également permettre la formation et la stabilité des fibres k pouvant atteindre plusieurs dizaines de microtubules en faisceau, reliant directement les kinétochores aux centrosomes.

D'autre part, les microtubules étant polarisés avec des extrémités (-) majoritairement concentrées au niveau de pôles, de nombreuses protéines doivent être impliquées dans le pontage et le glissement entre microtubules parallèles (au niveau des pôles) et antiparallèles (au centre du fuseau, au niveau de la chromatine). Ces protéines sont donc directement impliquées dans le maintien de l'intégrité des pôles et le maintien de la bipolarité.

Enfin, à l'échelle globale du fuseau, la balance entre polymérisation et dépolymérisation est finement régulée afin de maintenir la taille et le positionnement du fuseau malgré l'instabilité dynamique inhérente aux microtubules eux mêmes.

2- Les MAPs stabilisant les microtubules

De nombreuses protéines participent à stabiliser les microtubules, uniques ou en faisceaux, de par leur liaison le long de la paroi du microtubule, mais également en s'associant à leurs extrémités (+) ou (-). Dans une revue datant de 2013 (Helmke et al., 2013), les auteurs proposent trois mécanismes à l'origine d'une augmentation de la stabilité des microtubules : la stabilisation des dimères de tubuline ou des protofilaments, l'augmentation de croissance des microtubules et enfin la protection contre les événements de catastrophe. Cependant, de nombreuses protéines (et particulièrement les « +TIPs ») ont des mécanismes de régulation de la dynamique des microtubules largement méconnus ou controversés. J'ai donc décidé de séparer ces protéines en trois catégories selon leur localisation sur les microtubules : celles associées à l'extrémité (+) (les +TIPs), celles qui interagissent le long de la paroi des microtubules et celles associées aux extrémités (-) (les -TIPs).

a) Les +TIPs

De nombreuses protéines associées aux extrémités (+) des microtubules ont été largement étudiées, cependant leurs rôles exacts dans la régulation de la dynamique des microtubules sont toujours sujets à débat.

L'une des représentantes majeures de cette famille est EB1 (End Binding proteins). Cette +TIP (et les autres EBs : EB2 et 3) a montré différents effets selon les conditions expérimentales : alors qu'en cellules elle semble promouvoir la croissance et réduire les catastrophes (Komarova et al., 2009; Tirnauer et al., 2002; Wen et al., 2004), son comportement *in vitro* a révélé des résultats plutôt contradictoires. En effet EB1 (et les +TIPs de la famille EB) semble modifier les taux de croissance et de dépolymérisation de façon nuancée selon la concentration (Bieling et al., 2008; Bieling et al., 2007; Manna et al., 2008; Vitre et al., 2008), favoriser (Komarova et al., 2009; Vitre et al., 2008) ou protéger (Katsuki et al., 2009; Manna et al., 2008; Vitre et al., 2008) des catastrophes, ou encore n'avoir aucun effet (Dixit et al., 2009). Bon nombre des études citées précédemment s'accordent sur le fait qu'EB1 serait requise pour l'association d'autres +TIPs comme CLIP170 (Bieling et al., 2008; Blake-Hodek et al., 2010; Dixit et al., 2009) ou les CLASPs (Mimori-Kiyosue et al., 2005). A l'inverse, d'autres études ont montré que la liaison d'EB1 aux extrémités (+) dépend d'autres MAPs comme APC (Green et al., 2005) ou p150^{glued} (Manna et al., 2008).

Une autre +TIP beaucoup étudiée pour son rôle dans la stabilité des microtubules est la protéine CLIP170. Il a été montré *in vitro* que cette protéine a le potentiel de s'assembler aux extrémités (+) avec des oligomères de tubuline, ce qui participerait aux événements de sauvetage (Arnal et al., 2004). Il a également été montré qu'EB1 est nécessaire à sa localisation à l'extrémité (+) des microtubules (Bieling et al., 2008) et à son renouvellement rapide (Dixit et al., 2009). Chez la levure, ces deux +TIPs, organisées en complexe, auraient des effets opposés sur la dynamique des microtubules : Bim1 (orthologue d'EB1) diminuerait la fréquence des catastrophes alors que Bik1 (orthologue de CLIP170) favoriserait ces événements (Blake-Hodek et al., 2010). Ceci suggère que ces +TIPs antagonistes interagissent sans doute pour moduler leurs activités.

Les protéines CLASPs (Cytoplasmic Linker Associated Proteins) quant à elles favorisent les sauvetages en recrutant les dimères de tubuline mais pourraient aussi stopper les événements de catastrophe (Al-Bassam and Chang, 2011; Al-Bassam et al., 2010).

Les protéines Ch-TOG/XMAP215/Msps (Mini Spindle Protein) chez l'Homme, le Xénope et la *Drosophile* sont des MAP décorant les microtubules en interphase comme en mitose (à l'exception des microtubules astraux). Chez le Xénope, la déplétion de XMAP215 entraîne une augmentation de

la fréquence des catastrophes qui peut être sauvée par une perte de fonction de XKCM1/MCAK (Tournebize et al., 2000). Malgré une localisation au long du microtubule, XMAP215 va diffuser et s'enrichir aux extrémités (+) et former des complexes avec des dimères de tubuline pour faciliter leur incorporation à l'extrémité en croissance (Al-Bassam and Chang, 2011; Brouhard et al., 2008). Lorsque XMAP215 est déplétée en extrait de Xénope, la taille des asters est diminuée ce qui mène à l'assemblage de fuseaux largement désorganisés et très courts. A l'inverse, augmenter la concentration de XMAP215 va augmenter la vitesse de polymérisation des microtubules et proportionnellement la longueur du fuseau (Reber et al., 2013). De façon intéressante, une certaine redondance dans les mécanismes de croissance et stabilité des microtubules existent, ce qui indique l'importance pour la cellule de promouvoir la croissance des microtubules pour assembler son fuseau : par exemple, une augmentation de la concentration de XMAP215 permet de sauver partiellement le phénotype de déplétion de TPX2 ou de la γ -tubuline (Groen et al., 2009).

La +TIP MACF/ACF7 joue un double rôle : en favorisant le lien entre les extrémités (+) des microtubules et le réseau d'actine filamentaire, elle participe à stabiliser les microtubules, même si leur taille est réduite (Kodama et al., 2003). Ce lien entre les deux principaux composants du cytosquelette permet le maintien de la polarisation des cellules et leur capacité à migrer.

L'APC (Adematous Polyposis Coli) est localisée à l'extrémité (+) du microtubule au niveau du cortex cellulaire, quelque soit l'état du microtubule (polymérisation, dépolymérisation, catastrophe et sauvetage), ceci va permettre de favoriser la croissance et réduire la fréquence des catastrophes, diminuant par conséquent les épisodes de sauvetage (Kita et al., 2006). Dans cette dernière étude, le rôle d'APC semble être indépendant d'EB1, cependant il semble qu'APC soit essentiel à l'activité « anti-pause » d'EB1 lors de la polymérisation (Green et al., 2005).

Comme je viens de le décrire plus haut, ces +TIPs fonctionnent souvent à plusieurs pour réguler la dynamique des microtubules et assurer leurs fonctions dans la cellule, notamment en ce qui concerne leur attachement au cortex (Gundersen et al., 2004). Ainsi plusieurs mécanismes impliquant un récepteur cortical, une +TIP et une protéine de « pontage » ont été identifiés. Par exemple EB1 (la +TIP) et APC (protéine de pontage) stabilisent l'extrémité (+) des microtubules au cortex par le récepteur mDia (Wen et al., 2004), ce qui promeut la migration cellulaire. De même, CLASP1 et 2 se lient à EB1 pour réguler la dynamique des extrémités (+) au cortex (Mimori-Kiyosue et al., 2005). Dans l'embryon précoce de *C. elegans*, les CLASPs participent également à la régulation de la stabilité des microtubules astraux et donc au positionnement du fuseau (Espiritu et al., 2012). Enfin MAP4 et CLASP1 ont été montrées comme impliquées dans le positionnement du fuseau. CLASP1 permet le lien entre le microtubule et le cortex et MAP4 limite l'action du complexe DDC

(Dynein-Dynactin Complex) afin d'équilibrer aux deux pôles de la cellule les forces de traction sur les microtubules astraux (Samora et al., 2011).

Enfin, la +TIP PRC1 (Protein Required for Cytokinesis 1), en complexe avec la kinésine-4 va se lier spécifiquement aux extrémités (+) des microtubules. Ainsi, dans le cas de microtubules antiparallèles comme les microtubules interpolaires en métaphase ou au niveau du midbody, ceci va stabiliser les microtubules tout en limitant leur croissance, ce qui régule leur taille (Bechstedt and Brouhard, 2013; Walczak and Shaw, 2010).

L'activité des +TIPs, en plus de simplement réguler la dynamique des microtubules, va influencer sur de nombreux processus cellulaires en permettant des interactions avec différentes structures comme le cortex, l'actine, le réticulum endoplasmique, les vésicules et les kinétochores (Akhmanova and Steinmetz, 2010).

b) Les protéines associées à la paroi des microtubules

La famille MAP2/Tau, comprenant les protéines MAP2, Tau et MAP4, se fixe sur la paroi externe du microtubule et est connue pour son activité stabilisatrice : MAP2 et Tau semblent être spécifiques des neurones alors que MAP4 est présente dans beaucoup d'autres tissus mais exclue des neurones (Dehmelt and Halpain, 2004). Après traitement au Nocodazole, MAP2 a la capacité de reformer des faisceaux de microtubules (Takemura et al., 1995) et MAP4 stabilise les microtubules, parvenant à antagoniser légèrement l'effet du Nocodazole (Nguyen et al., 1997). En plus de favoriser le « bundling » de microtubules, cette classe de MAP semble, par sa liaison à la paroi des microtubules, influencer sur l'instabilité dynamique des microtubules en réduisant la fréquence et la durée des catastrophes. Par exemple MAP2 peut stopper les événements de catastrophe lorsqu'elle se concentre dans une région précise du microtubule (Ichihara et al., 2001). L'activité stabilisatrice de cette famille de MAP passe par une stabilisation intra-protofilament. En effet, il a été montré que Tau et MAP2 interagissent avec deux dimères d'un même protofilament (Al-Bassam et al., 2002).

HURP (Mars chez la Drosophile) est un autre exemple de MAP stabilisant les microtubules. Mars localise spécifiquement sur les fibres k et est nécessaire à leur formation. De plus, les fuseaux mitotiques (et particulièrement les fibres k) résistent beaucoup mieux au traitement par le froid en présence de Mars/HURP (Yang and Fan, 2008). Même si l'assemblage de telles structures n'a pas été confirmé *in vivo*, HURP semble impliqué dans la formation de feuilletts de tubuline qui viendraient s'enrouler autour des microtubules (Santarella et al., 2007). Ceci suggère un rôle potentiel de HURP dans l'assemblage de structures très stables de microtubules, telles que les faisceaux de microtubules ou les fibres k.

Un autre exemple de MAP impliquée dans la stabilité des microtubules est TPX2. Comme HURP, cette protéine est localisée sur les fibres k, autant chez la Drosophile que chez l'Homme. La surexpression de hTPX2 (humanTPX2) va entraîner la formation de faisceaux de microtubules (Gruss et al., 2002), résultat confirmé avec D-TPX2 (Drosophile-TPX2) *in vitro* (Goshima, 2011).

Enfin, le γ -TuRC qui n'est pas requis pour la viabilité chez la Drosophile, se lie le long des microtubules interphasiques et semble favoriser les pauses lors d'épisodes de dépolymérisation et promeut également les sauvetages (Bouissou et al., 2009). En effet, en plus de son rôle dans la nucléation, les auteurs proposent qu'en se liant aux microtubules, le γ -TuRC pourrait réguler négativement la dynamique globale des microtubules en limitant la fréquence des catastrophes, ce qui stabilise les microtubules. Très récemment, une étude a montré que la perte de fonction du γ -TuRC en cellules S2 et HeLA augmente la dynamique des microtubules astraux, entraînant des défauts de positionnement du fuseau. Ces effets pourraient être expliqués par une localisation d'EB1 plus diffuse et la présence de nombreux îlots GTP dans la paroi du microtubule (Bouissou et al., 2014). A l'inverse, une diminution de la dynamique des microtubules (en ajoutant du Taxol, du Nocodazole ou en diminuant la quantité d'EB1) restaure le positionnement du fuseau lorsque l'assemblage du γ -TuRC est compromis. Ceci confirme le rôle de ce complexe dans la stabilité des microtubules. La liaison du γ -TuRC sur la paroi du microtubule affecte donc indirectement la dynamique de l'extrémité (+).

c) Les -TIPs

Les complexes de γ -tubuline, et particulièrement le γ -TuSC, en plus de leur pouvoir de nucléation, ont également un rôle dans la stabilité des extrémités (-). En effet, chez la levure, dans un contexte mutant *mto1 Δ* (orthologue de la Centrosomine) où la nucléation non centrosomale n'est plus possible, Alp4/GCP2 est toujours localisé aux extrémités (-) stables, même quand les protéines spécifiques du γ -TuRC sont absentes (Anders and Sawin, 2011).

Depuis très récemment, un nouveau mécanisme contribuant à augmenter la stabilité des microtubules a été mis à jour : c'est la protection des extrémités (-) contre l'activité de dépolymérisation de certaines protéines. La Patronine localise au niveau des centres organisateurs des microtubules et sa perte de fonction est sauvée par la perte de fonction de Klp10A/MCAK, une kinésine déstabilisatrice (Goodwin and Vale, 2010). Il y a donc une compétition entre la dépolymérisation et la protection aux niveaux de ces extrémités. Les auteurs posent l'hypothèse que la Patronine reconnaît l' α -tubuline exposée aux extrémités (-) des microtubules et formerait en quelque sorte une cape protectrice. Cependant, selon les besoins de la cellule à modifier son réseau de microtubules, par exemple lorsqu'elle doit dépolymériser les microtubules interphasiques pour

entrer en mitose, l'affinité de la Patronine pour les microtubules est certainement modifiée (O'Rourke and Sharp, 2011). Très récemment, il a été montré que les protéines de la famille CAMSAP/Nezha/Patronin peuvent réguler une croissance lente et intermittente des microtubules par les extrémités (-) (Jiang et al., 2014).

Une autre protéine ayant aussi pour rôle de contrebalancer l'action de MCAK aux extrémités (-) a été identifiée. Elle serait cependant restreinte aux fibres k et s'appelle MCRS1 (MiCRoSpherule protein 1). Requis pour l'assemblage de fuseaux acentrosomaux, cette MAP est régulée par le gradient de RanGTP et participe à la stabilisation des fibres k (Meunier and Vernos, 2011).

3 – Les protéines qui déstabilisent les microtubules

Parallèlement, la déstabilisation des microtubules va également jouer un rôle dans l'assemblage du fuseau et particulièrement dans le contrôle de la taille du fuseau. Différents paramètres vont favoriser la déstabilisation des microtubules : les kinésines déstabilisatrices des familles 8 et 13, les enzymes de clivage comme la Katanine et la séquestration des dimères libres de tubuline.

a) Les kinésines déstabilisatrices

Deux familles principales de kinésines sont impliquées dans la dépolymérisation des microtubules : les kinésines 8 et 13. Ces deux familles de kinésines ont des rôles physiologiques divers de part leur action sur l'organisation du réseau de microtubules, autant en mitose (au niveau des kinétochores, des pôles et la régulation des microtubules astraux) qu'en interphase (formation et longueur des cils, croissance unidirectionnelle des axones) (pour revue, (Walczak et al., 2013)). Alors que les kinésines 13 diffusent de façon bidirectionnelle sur le microtubule et favorisent la dépolymérisation en courbant un protofilament, les kinésines 8 ne vont agir que sur les extrémités (+) en supprimant la dynamique, courbant les protofilaments (Kif18A chez l'Homme) ou en enlevant des dimères de tubuline de l'extrémité (Kip3 chez la levure) (Walczak et al., 2013).

Plusieurs études en extrait de Xénope ont montré que XKCM1/MCAK, de la famille des kinésines 13, est localisée au niveau des pôles et des kinétochores et qu'elle est indispensable à l'établissement du fuseau bipolaire (Ohi et al., 2004; Walczak et al., 1996). Sa déplétion entraîne deux principaux phénotypes : un mauvais alignement des chromosomes en métaphase ou un fuseau monopolaire anormalement large. Au niveau mécanistique, la déplétion de MCAK semble fortement réduire la fréquence des catastrophes (Walczak et al., 1996). A l'inverse, la surexpression de MCAK va engendrer une trop grande instabilité des microtubules qui seront trop courts et auront des difficultés à assembler un fuseau. Les quelques fuseaux assemblés lors de cette surexpression sont

considérablement raccourcis, de façon dépendante du niveau de surexpression (Ohi et al., 2007). En cellules PtK2, la déplétion de MCAK diminue également le nombre de catastrophe et inversement, sa surexpression l'augmente. Ceci impacte l'assemblage du fuseau lui-même ainsi que la longueur des microtubules astraux (Kline-Smith and Walczak, 2002). La déplétion de MCAK entraîne également un allongement du fuseau chez l'Homme (Domnitz et al., 2012) comme chez la Drosophile (Klp10A, (Goshima et al., 2005b)). MCAK se lie aux microtubules et participe à la dépolymérisation de façon ATP dépendante (Walczak et al., 2013). Dans cette même famille, XKIF2/Kif2A partage une localisation similaire à MCAK (aux pôles et aux kinétochores) mais est incapable de sauver la déplétion de MCAK et a moins d'effet sur la longueur du fuseau que la protéine MCAK (Ohi et al., 2007). Un dernier exemple de cette famille de kinésine est Kif2B qui joue, de concert avec MCAK, un rôle dans la correction des erreurs d'attachements kinétochores-microtubules. Kif2B semble promouvoir le renouvellement des contacts kinétochores-microtubules spécifiquement en prométaphase (Bakhom et al., 2009; Manning et al., 2010).

De par leur action de dépolymérisation seulement aux extrémités (+), les kinésines 8 n'ont pas de rôle aux niveaux des pôles dans le flux des microtubules mais seulement au niveau des interactions microtubule-chromosome et microtubule-cortex cellulaire. Ainsi, Klp67A, l'orthologue de Klp18A chez la Drosophile régule la congression et la longueur du fuseau (Savoian and Glover, 2010). Chez l'Homme, Klp18A est impliquée dans la congression en réduisant l'oscillation des chromosomes en prométaphase (Stumpff et al., 2008).

Je ne décrirai pas ces phénomènes mais en plus d'être impliquées dans le positionnement des chromosomes et les corrections d'erreurs d'attachement kinétochore-microtubule, ces kinésines ont un rôle dans la dépolymérisation qui survient en anaphase. Cette dépolymérisation à partir des pôles et des kinétochores va permettre la séparation rapide des deux lots de chromatides sœurs (Gadde and Heald, 2004; Walczak et al., 2013).

b) Le clivage

Plusieurs enzymes de la famille AAA-ATPase sont responsables du clivage des microtubules. La Katanine est composée de deux sous-unités, p60 et p80, et possède une activité de clivage des microtubules de la phase M en extrait de Xénope. Elle est concentrée au niveau des pôles du fuseau en cellules de vertébrés (McNally and Thomas, 1998). Le clivage par la Katanine va donc créer deux nouveaux microtubules et la nouvelle extrémité (-), non protégée, va perdre en stabilité et dépolymériser. Ceci suggère donc un rôle dans le contrôle de la taille du fuseau. Il a été montré plus récemment que la Katanine pourrait cibler son activité sur les défauts dans la paroi des microtubules (changement du nombre de protofilaments) mais également au niveau des extrémités (+), en

fonction de sa concentration (Diaz-Valencia et al., 2011). Par son activité aux extrémités (+), la Katanine régule les interactions microtubules-cortex cellulaire, jouant sur la migration cellulaire (Zhang et al., 2011).

D'autres enzymes de clivage ont été identifiées chez différentes espèces comme la Spastine et la Fidgetine (Roll-Mecak and McNally, 2010). Elles ont la caractéristique commune, avec la Katanine, d'utiliser l'énergie de l'hydrolyse de l'ATP pour cliver les microtubules. Chez l'Homme, la Fidgetine partage les mêmes fonctions que la Katanine, à savoir le clivage et la dépolymérisation par les extrémités (Mukherjee et al., 2012). Cette protéine localise également aux centrosomes et agit sur sa morphologie, impacte la vitesse de séparation des chromatides sœurs en anaphase A et régule négativement le nombre de microtubules astraux.

c) La séquestration des dimères de tubuline

Une famille de protéines codées par les gènes Stathmines (4 chez l'humain et un seul chez la Drosophile (Lachkar et al., 2010)) est responsable de cette activité de séquestration. En 1996 a été publiée la première étude concernant l'identification d'OP18 (OncoProtein 18), capable d'interagir avec les dimères de tubuline et dont l'activité de déstabilisation des microtubules est caractérisée par une augmentation du taux de catastrophe (Belmont and Mitchison, 1996). Op18 a une régulation dépendante de sa phosphorylation par les CDK (Marklund et al., 1996) et Aurora B (Gadea and Ruderman, 2006). Ces phosphorylations, qui prennent place en phase M, vont toutes deux inhiber l'activité d'Op18 et favoriser la présence d'un maximum de tubuline libre pour la formation du fuseau. Le rôle déstabilisateur indirect par séquestration de tubuline est maintenant bien établi (Cassimeris, 2002; Steinmetz, 2007) cependant un rôle direct a récemment été publié (Gupta et al., 2013). La Stathmine serait capable de se lier à différentes formes de polymères de tubuline, et particulièrement les protofilaments courbés présents aux extrémités en croissance. Ceci permettrait de réduire la coiffe GTP aux extrémités (+), augmentant le risque de catastrophe, et de rendre impossible l'incorporation de dimère aux extrémités (-).

4- Les modifications post-traductionnelles

Comme la plupart des protéines, les tubulines subissent des modifications post-traductionnelles. La plupart de ces modifications sont réversibles et sont susceptibles de modifier la dynamique des microtubules. On retrouve trois modifications majeures : l'acétylation de la lysine 40 de l' α -tubuline, la détyrosination en C-terminal de l' α -tubuline (qui peut être suivie d'une seconde protéolyse de l'acide glutamique désormais en C-terminal de l' α -tubuline, double modification

appelée $\Delta 2$) et la poly-glutamylation et poly-glycylation de la queue C-terminale des α et β -tubulines (Etienne-Manneville, 2010; Wloga and Gaertig, 2010).

La détyrosination de l' α -tubuline joue un double rôle pour la stabilité des microtubules. Premièrement, des souris KO pour *ttl* (Tubulin Tyrosin Ligase) présentent une augmentation de la quantité de microtubules assemblés à partir tubuline détyrosinée, ce qui inhibe l'action de MCAK (Peris et al., 2009) et augmente donc la stabilité des microtubules. Deuxièmement, la détyrosination inhibe la liaison de CLIP170 aux extrémités (+) ceci en affectant le recrutement des protéines possédant un domaine CAP-Gly (Peris et al., 2006). Ainsi, la tubuline ajoutée aux extrémités (+) est tyrosinée, favorisant la liaison avec CLIP170 puis détyrosinée, ce qui inhibe l'action de protéines comme MCAK. Ceci favorise donc la stabilité des microtubules, mettant en avant l'importance du cycle tyrosination (par TTL) détyrosination (par CCP1) de la tubuline. Ainsi, les fibroblastes issus de souris KO pour *ttl* présentent des anomalies de morphologie de cellule et de positionnement du fuseau (Peris et al., 2006).

Les dimères de tubuline détyrosinés relâchés lors de la dépolymérisation peuvent être tyrosinés à nouveau par TTL. Cependant, l' α -tubuline détyrosinée du microtubule peut subir une nouvelle protéolyse en C-terminal de l'acide glutamique. Cette modification post-traductionnelle est appelée $\Delta 2$ et cette tubuline, une fois relâchée ne peut être tyrosinée, ce qui limite la quantité de tubuline subissant le recyclage (Lafanechere and Job, 2000).

Alors que la glycylation est principalement limitée à la tubuline incorporée dans les axonèmes (flagelles et cils) la glutamylation est présente dans les axonèmes, les centrioles et le fuseau mitotique (Hammond et al., 2008). La poly-glutamylation semble avoir des effets inverses sur les microtubules, recrutant à tour de rôle des MAPs stabilisatrices comme MAP2 et Tau ou des enzymes de clivage (Wloga and Gaertig, 2010).

Ces deux types de modifications post-traductionnelles étant sur la queue C-terminale des α -et/ou β -tubulines, elles se retrouvent donc sur la paroi extérieure du microtubule. Ceci explique l'effet qu'elles peuvent avoir sur la liaison ou non de MAPs, à l'inverse de l'acétylation de la lysine 40 de l' α -tubuline qui se trouve dans la lumière du microtubule. Le rôle de cette dernière modification post-traductionnelle dans la dynamique des microtubules est moins clair : n'affectant ni la distribution des protofilaments, ni les paramètres hélicoïdaux des microtubules (Howes et al., 2014), et probablement peu la liaison de la plupart de MAPs (qui se lient sur la paroi externe des microtubules), l'acétylation de la tubuline est associée aux cils, une structure de microtubules particulièrement stable.

5 – Les moteurs

En plus de ces facteurs qui stabilisent ou déstabilisent les microtubules, des moteurs sont nécessaires à l'organisation de ces microtubules en un fuseau bipolaire ; ceci en jouant sur différentes étapes : la séparation des centrosomes, la bipolarité, l'intégrité des pôles du fuseau et la congression des chromosomes.

a) La séparation des centrosomes et l'établissement de la bipolarité

Deux moteurs majeurs sont impliqués dans la séparation des centrosomes : la kinésine-5 Eg5 (Klp61F chez la Drosophile) et la Dynéine.

Au niveau mécanistique, Eg5 est un homotétramère (Cole et al., 1994) ayant pour fonction le « cross-link » entre microtubules et le déplacement vers les extrémités (+) (Kapitein et al., 2005). Lorsque les microtubules pontés par Eg5 sont antiparallèles, la fonction motrice vers les extrémités (+) va permettre d'écartier au maximum les extrémités (-) l'une de l'autre. Ceci va donc favoriser la séparation des centrosomes en les écartant l'un de l'autre (figure 8), mais également la bipolarité du fuseau (décrit plus loin). Ainsi chez de nombreuses espèces, la déplétion d'Eg5 ou le traitement par le Monastrol (une drogue inhibitrice d'Eg5) entraîne la formation de fuseaux monopolaires du fait d'une séparation incomplète des centrosomes (Blangy et al., 1995; Heck et al., 1993; Kapoor et al., 2000; Tanenbaum et al., 2008). Cependant, chez l'embryon de Drosophile, il a été montré que l'injection d'anticorps bloquants contre Klp61F (orthologue d'Eg5) n'altère pas la séparation des centrosomes en prophase mais fait s'effondrer le fuseau avant la métaphase (Sharp et al., 1999b). Malgré un rôle incontestable dans la séparation des centrosomes dans la plupart des modèles, cette kinésine ne semble pas être seule à assurer cette fonction. Ainsi le phénotype dû à la perte de fonction d'Eg5 est restauré par la perte de la Dynéine, Lis1 et CLIP170 (Tanenbaum et al., 2008). D'un point de vue fonctionnel, HSET/NCD (NonClaret Disjonctional) semblent avoir un effet opposé à celui d'Eg5 dans la formation d'asters acentrosomiaux, la double déplétion entraînant des asters comparables au contrôle (Mountain et al., 1999). Mais la déplétion d'HSET ne semble pas restaurer les défauts de séparation des centrosomes causés par la perte de fonction d'Eg5, malgré ce qui a été publié par Sharp et collaborateurs (Sharp et al., 2000).

Une autre kinésine appelée Kif15/Xklp2, de la famille des kinésines-12, semble partager la fonction de maintien de la bipolarité avec Eg5 (Dumont, 2012). Malgré une étude montrant le contraire (Boleti et al., 1996), la délétion de cette protéine ne semble pas affecter la séparation des centrosomes (Tanenbaum et al., 2009; Zhu et al., 2005). Sa surexpression peut cependant restaurer

la bipolarité dans le cas d'une perte de fonction d'Eg5, mais pas la séparation des centrosomes ((Tanenbaum et al., 2009); détaillé dans la partie suivante).

Le dernier acteur majeur de la séparation des centrosomes est le moteur dirigé vers les extrémités (-) qui est la Dynéine. Plusieurs études ont souligné le rôle de la Dynéine dans la séparation des centrosomes, chez l'embryon de *Drosophile* (Robinson et al., 1999; Sharp et al., 2000) et l'embryon précoce de *C. elegans* (Gonczy et al., 1999). Chez la *Drosophile*, l'étude d'embryons mutants pour *dhc64C* (gène codant pour la chaîne lourde de la Dynéine) a révélé que ce complexe est requis pour l'attachement et la migration des centrosomes le long de l'enveloppe nucléaire (Robinson et al., 1999), en synergie avec Klp61F/Eg5 (Sharp et al., 2000). Klp61F et la Dynéine ont cependant des forces qui s'opposent car la double déplétion restaure un phénotype sauvage. Chez l'embryon précoce de *C. elegans*, de nombreux phénotypes découlent de la déplétion de différentes sous-unités du complexe Dynéine/Dynactine, dont le défaut de migration du pronucleus mâle, le défaut de séparation des centrosomes, le détachement des centrosomes de l'enveloppe nucléaire et des défauts d'orientation de fuseau (Gonczy et al., 1999). Grâce à ses études, deux modèles probablement non-exclusifs ont été avancés : d'après Sharp, la Dynéine permettrait, par l'ancrage au cortex des microtubules et son activité motrice vers les extrémités (-) (donc vers les centrosomes), de séparer à l'aide d'Eg5 les deux centrosomes. Gönczy propose un modèle selon lequel la Dynéine est ancrée à l'enveloppe nucléaire et, grâce à son activité processive vers les extrémités (-), tire les centrosomes de part et d'autre du noyau (figure 8).

Cependant, quelque soit le modèle, des zones d'ombres perdurent toujours : les microtubules émanant des deux centrosomes dans toutes les directions, dans le cas de cellules non polarisées, des interactions aléatoires avec les Dynéines (au cortex ou sur l'enveloppe nucléaire) résulteraient en des forces de traction et poussée qui s'annulent, ne favorisant en rien la séparation des centrosomes.

Suite à une étude montrant que les microtubules rencontrant des obstacles pendant une phase de croissance vont entrer plus vite en catastrophe (Janson et al., 2003), une explication a été avancée, suggérant que les microtubules nucléés à partir des centrosomes qui entreraient en contact subiraient des événements des catastrophes. Ce phénomène briserait la symétrie de nucléation des microtubules par les centrosomes, favorisant des forces de traction opposées pour chaque centrosome (Tanenbaum and Medema, 2010).

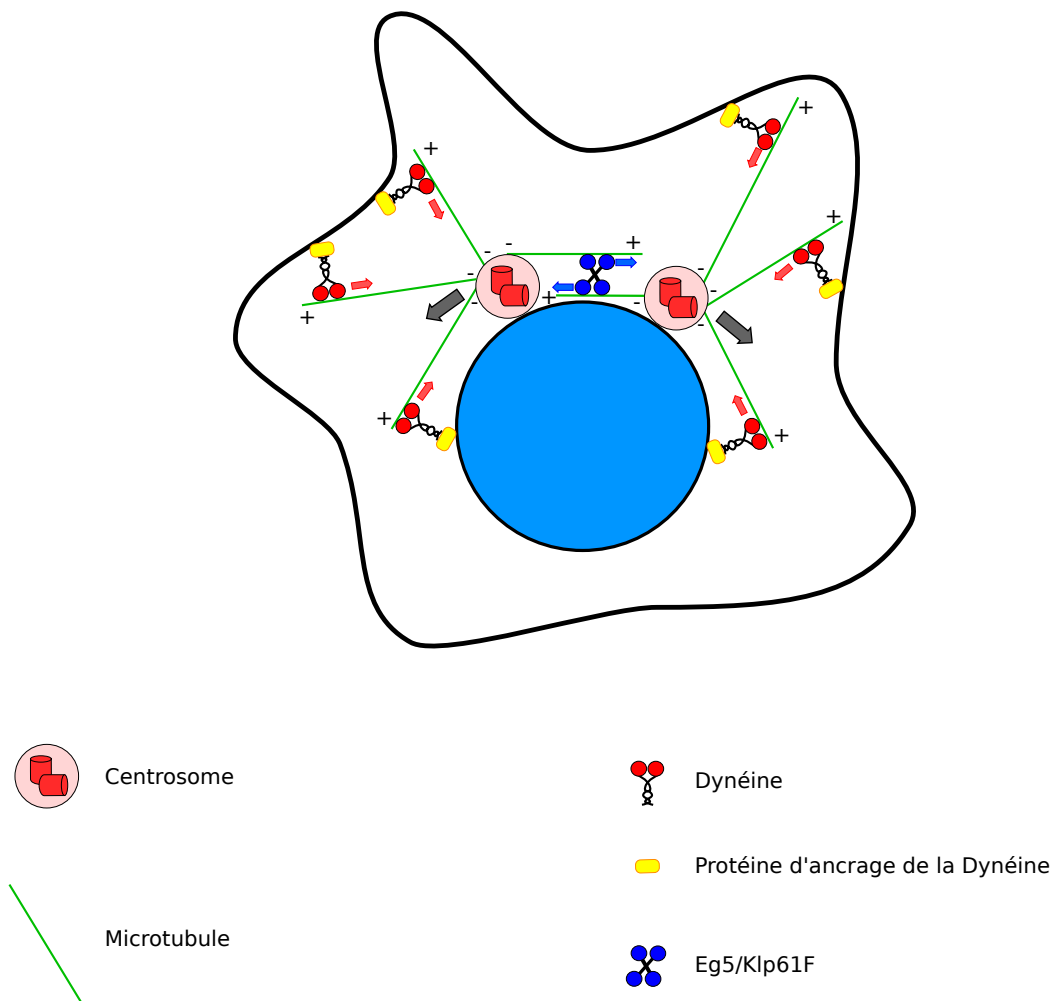


Figure 8 : Les moteurs moléculaires et la séparation des centrosomes à l'entrée de la mitose.

Deux moteurs moléculaires sont impliqués dans la séparation des centrosomes : la Dynéine (rouge) et Eg5/Klp61F (bleu). La Dynéine a une activité motrice dirigée vers les extrémités (-) (flèches rouges). Ainsi, en liant de façon stable les membranes cellulaire et nucléaire par l'intermédiaire de protéines d'ancrage (jaune), elle va pouvoir, grâce à son activité motrice, tirer vers elle les extrémités (-) et donc séparer les centrosomes (flèches grises). Eg5/Klp61F est un homotétramère capable de lier entre eux des microtubules. Ce moteur moléculaire possède une activité motrice dirigée vers les extrémités (+) (flèches bleues). Dans le cas de microtubules antiparallèles, comme c'est le cas pour des microtubules entre deux centrosomes, sa mobilité vers les extrémité (+) va avoir pour effet d'éloigner les extrémités (-) l'une de l'autre. Ceci va également favoriser la séparation des centrosomes (flèches grises).

b) Le maintien de la bipolarité

Une fois les centrosomes correctement séparés et donc la bipolarité établie en prophase, l'assemblage du fuseau en lui-même commence et la bipolarité installée ultérieurement doit être maintenue tout au long de la mitose.

En faisant glisser les microtubules antiparallèles les uns contre les autres grâce à son activité motrice vers les extrémités (+) (Kapitein et al., 2005), Eg5 participe à la robustesse du fuseau et au maintien de sa bipolarité. De plus, comme expliqué précédemment, l'ajout d'anticorps bloquants contre Klp61F dans l'embryon de *Drosophile* ne cause pas de défaut de séparation des centrosomes en prophase mais les fuseaux s'effondrent et deviennent monopolaires en prométaphase (Sharp et al., 1999b). Enfin, par modélisation informatique de l'organisation du fuseau méiotique (acentrosomal) du *Xénope*, Eg5 semble faire partie du minimum requis pour assembler un fuseau bipolaire (Loughlin et al., 2010).

Cependant, dans de nombreux autres modèles dont les mammifères, Eg5 ne semble être impliqué que dans la séparation des centrosomes et non dans le maintien de la bipolarité (Kollu et al., 2009). Ceci suggère donc l'implication d'une autre protéine. Malgré une étude montrant clairement l'implication de Xklp2 dans la séparation des centrosomes et la bipolarité du fuseau (Boleti et al., 1996), plusieurs études dans les années qui ont suivi semblent très mitigées sur le rôle de cette kinésine. Du point de vue mécanistique, Xklp2 nécessite TPX2 pour sa localisation sur le fuseau et particulièrement aux pôles. Cependant sa déplétion ne semble pas affecter la bipolarité du fuseau (Wittmann et al., 2000). En 1998, une étude avait déjà montré que Xklp2 n'a que peu d'effet sur la bipolarité de fuseau méiotique chez le *Xénope*, n'affectant que faiblement l'intégrité des pôles du fuseau (Walczak et al., 1998). Ce n'est que plus tard que le rôle de cette kinésine s'éclaircit. Lors de la méiose femelle chez *C. elegans*, la déplétion de KLP-18, l'orthologue de Xklp2, mène à un sévère défaut d'assemblage du fuseau (Segbert et al., 2003). Ce défaut n'apparaît plus en mitose. Chez l'humain, la déplétion de Hklp2/Kif15 seule ne révèle pas de phénotype mais renforce le phénotype observé après traitement des cellules au Monastrol (Vanneste et al., 2009). Une autre étude confirme ce rôle pour Kif15 dans le cas d'une sensibilisation par une autre drogue inhibitrice de la kinésine-5 : la STLC (S-Trityl-L-Cystéine) (Tanenbaum et al., 2009). Cette kinésine semble donc avoir un rôle redondant avec Eg5, sa déplétion n'entraînant un phénotype que dans un contexte où Eg5 est partiellement inhibé. Enfin, lorsque la dynamique des microtubule est altérée par ARNi contre TOGp/XMAP215 ou traitement au Nocodazole et qu'Eg5 est inhibé, Hklp2/Kif15 est capable de restaurer l'assemblage d'un fuseau bipolaire (Dumont, 2012; Florian and Mayer, 2011).

Enfin, il faut noter le cas particulier de la Drosophile qui n'a pas d'orthologue de Xklp2/Kif15. Ceci expliquerait pourquoi la déplétion de Klp61F induit principalement des défauts de maintien de la bipolarité.

c) L'intégrité des pôles

L'intégrité des pôles est médiée par des moteurs dirigés vers les extrémités (-) des microtubules : les deux principaux représentants sont la Dynéine et les kinésines-14 NCD/HSET/XCTK2.

En plus de son rôle dans la séparation des centrosomes détaillé plus haut, la Dynéine permet également le regroupement des extrémités (-) au niveau des pôles. Dans le cas d'un fuseau acentrosomal, la perte de fonction de la Dynéine entraîne une perte de l'intégrité des pôles qui ne sont plus du tout focalisés (Heald et al., 1996; Merdes et al., 2000). Grâce à son activité motrice vers les extrémités (-) la Dynéine permet l'accumulation au pôle de la protéine NuMA (figure 9). En effet la déplétion de la Dynéine délocalise NuMA des pôles et la délétion de NuMA induit le même phénotype de perte d'intégrité des pôles que la délétion de la Dynéine ou Dynactine (Merdes et al., 2000). Le complexe DDC (Dynein Dynactin Complex) agit donc de concert avec NuMA pour maintenir l'intégrité des pôles. En présence de centrosomes, la perte de fonction de la Dynéine entraîne un décrochement des centrosomes des pôles du fuseau (Goshima et al., 2005a; Morales-Mulia and Scholey, 2005; Romé et al., 2010) en plus du défaut de regroupement des microtubules au niveau des pôles. Morales-Mulia & Scholey montrent dans cette étude que la déplétion de la Dynéine influe également sur la localisation d'Asp/ASPM et Klp10A/MCAK et permet d'expliquer le phénotype observé sur l'organisation des pôles, mais également sur le contrôle de la longueur du fuseau respectivement. De même, en extrait de Xénope, la Dynéine et NuMA régulent la longueur du fuseau et le flux vers les pôles en maintenant Kif2a (et non MCAK) aux pôles (Gaetz and Kapoor, 2004). Enfin la Dynéine serait impliquée dans la localisation en dehors de la partie centrale du fuseau du moteur Eg5, qui pourrait également contribuer au « cross-link » de microtubules parallèles (Uteng et al., 2008). Ceci explique la localisation d'Eg5 aux pôles (Sharp et al., 1999a) et son rôle dans les flux de microtubules en direction des pôles (Miyamoto et al., 2004) qui correspond en fait à la balance entre extrémités (+) en croissance et extrémités (-) en dépolymérisation aux pôles.

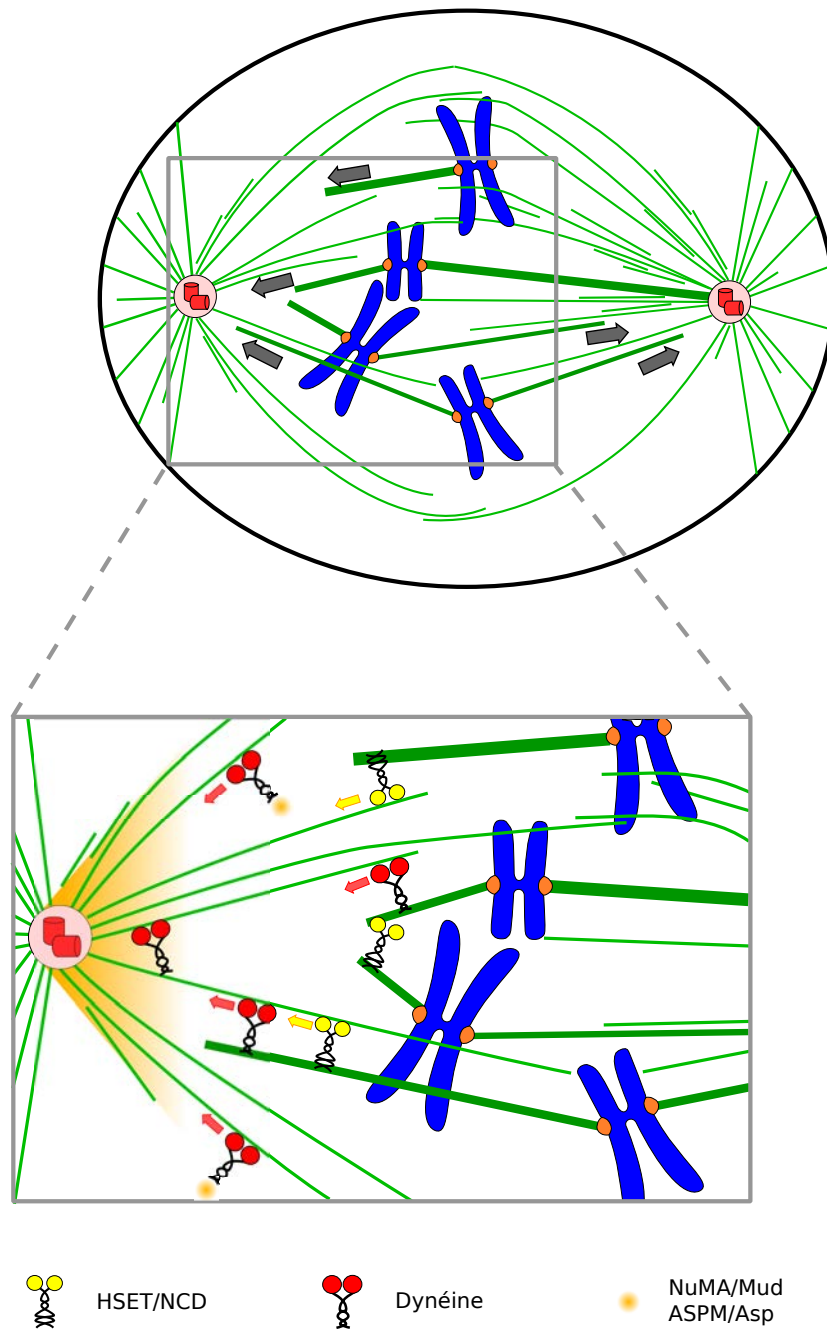


Figure 9 : Les moteurs moléculaires et l'intégrité des pôles du fuseau.

Deux moteurs moléculaires majeurs sont impliqués dans l'intégrité des pôles du fuseau : HSET/NCD (jaune) et la Dynéine (rouge). Ces moteurs ont tous les deux une activité motrice vers les extrémités (-) (flèches jaunes pour NCD et rouges pour Dynéine) mais des fonctions non redondantes. Une fraction de HSET/NCD semble impliqué dans le « cross link » entre fibres k et une autre fraction serait active dans le transport des fibres k vers les extrémités (-) (flèches jaunes). La Dynéine partage avec NCD la fonction de transport des fibres k vers les extrémités (-) (flèches rouges) mais est également impliquée dans l'accumulation aux pôles de protéines comme NuMA et ASPM (orange), impliquées dans l'organisation et l'intégrité des pôles.

L'autre protéine majeure dans l'organisation des pôles du fuseau est la kinésine-14 NCD. Du point de vue du phénotype de déplétion, elle semble partager avec la Dynéine l'organisation des pôles (Endow et al., 1994) (figure 9). Cependant, la Dynéine et NCD ne sont pas redondantes et les phénotypes sont légèrement différents : la déplétion de la Dynéine n'affecte que les pôles alors que la déplétion de NCD transforme le fuseau en une multitude de petits fuseaux (Morales-Mulia and Scholey, 2005). Cette étude montre donc la complémentarité de ces deux moteurs et leur implication dans deux voies d'organisation des pôles différentes. En co-déplétant ces deux moteurs, les défauts d'organisation du fuseau sont encore plus sévères (Goshima et al., 2005a). Dans cette étude, les auteurs montrent également que NCD est capable de marquer l'extrémité (+) des microtubules de façon EB1-dépendante. Ils dressent donc un modèle selon lequel une fraction de NCD va être capable de faire le « cross-link » entre les fibres k alors qu'une seconde fraction de NCD, localisée aux extrémités (+) des microtubules nucléés par le centrosome, va entrer en contact avec les fibres k grâce au phénomène de « recherche et capture » et les transporter vers les centrosomes. D'après ce modèle, la Dynéine va seulement permettre le transport des fibres k vers les extrémités (-) des microtubules émanant du centrosome, et donc l'ancrage de ce centrosome au pôle (figure 9).

Enfin, la Dynéine est impliquée dans l'ancrage des microtubules astraux au cortex et donc dans le positionnement du fuseau. Ceci va avoir un rôle primordial dans l'orientation du fuseau lors des divisions asymétriques ((Kardon and Vale, 2009) ; détaillé plus loin).

d) La congression par les chromokinésines

Jusqu'à présent, deux familles de kinésines ont été identifiées comme liant non seulement les microtubules mais aussi les chromosomes. Ce sont les kinésines des familles 4 et 10, responsables du phénomène appelé la « force d'éjection polaire ». Les protéines Xklp1 et Xkid (des familles 4 et 10 respectivement) ont une mobilité dirigée vers les extrémités (+) et ont pour rôle de pousser les bras des chromosomes au plus loin possible des pôles du fuseau.

La protéine Xkid, de la famille des kinésines-10, est liée aux chromosomes métaphasiques et sa déplétion en extrait de Xénope induit de sévères défauts d'alignement des chromosomes sur la plaque métaphasique en inhibant complètement la congression. De plus, alors que Xkid est absent des chromosomes anaphasiques, suite à une dégradation ubiquitine-dépendante, sa surexpression abolit la séparation des chromatides sœurs (Antonio et al., 2000; Funabiki and Murray, 2000). En cellules humaines, le rôle de Kid (orthologue humain de Xkid) semble être différent : tout d'abord, Kid est localisé sur les chromosomes durant toute la durée de la mitose et sa déplétion semble n'affecter que les oscillations et pas la congression dans la grande majorité des cas (Levesque and

Compton, 2001). Enfin, sa délétion semble également jouer sur la longueur du fuseau et la robustesse des fibres k (Tokai-Nishizumi et al., 2005).

L'autre chromokinésine Xklp1/KIF4/Klp3A de la famille des kinésines-4 contribue également à l'alignement des chromosomes le long de la plaque métaphasique (Vernos et al., 1995; Walczak et al., 1998) mais en plus, elle pourrait participer à l'extension des pôles (Walczak et al., 1998). Cette kinésine semble négativement réguler la masse totale de microtubules du fuseau en diminuant la polymérisation à partir des centrosomes (Castoldi and Vernos, 2006). L'orthologue humain, KIF4, est impliqué dans l'alignement des chromosomes mais également dans l'organisation du fuseau, la condensation des chromosomes et la ségrégation fidèle des chromatides sœurs (Mazumdar et al., 2004). Comme en cellules humaines, Klp3A chez la Drosophile, en plus d'être localisée sur les chromosomes, est retrouvée également au niveau du fuseau central et du « midbody » en anaphase et télophase (Kwon et al., 2004). Chez la Drosophile, la déplétion de Klp3A semble avoir un impact sur l'organisation des microtubules interpolaire et sur la longueur du fuseau. Klp3A pourrait, comme son orthologue chez le Xénope, participer à l'extension des pôles en prométaphase (en antagonisant NCD, dirigé vers les extrémités (-)) ; et également faciliter la mobilité des chromatides en anaphase et télophase.

Il est intéressant de noter que chez la Drosophile, la double déplétion de Nod/Kid et Klp3A/KIF4 montre un phénotype plus sévère d'alignement des chromosomes en métaphase que les simples déplétions (Goshima and Vale, 2003). Cette observation suggère une redondance fonctionnelle.

C - Le point de contrôle de l'assemblage du fuseau mitotique

Dans les parties précédentes, j'ai détaillé les différents composants du fuseau mitotique, les différents types de microtubules et comment certaines protéines participent à l'organisation de ces microtubules en un fuseau bipolaire fonctionnel. Cependant, le défi majeur de la cellule en mitose est d'assurer une ségrégation des chromatides sœurs de façon équitable entre les deux cellules filles, sans aucune perte d'information génétique. La transition métaphase/anaphase est donc une étape critique : les kinétochores doivent tous être attachés correctement aux microtubules du fuseau. Un système de surveillance est alors mis en place pour vérifier que ces attachements kinétochores-microtubules sont corrects, c'est le point de contrôle de l'assemblage du fuseau mitotique ou SAC (Spindle Assembly Checkpoint). Lorsque les attachements kinétochores-microtubules sont corrects, le SAC permet la levée de l'inhibition de l'anaphase ; démarre alors la séparation physique des chromatides sœurs.

1 – La structure du kinétochore

Le kinétochore est une structure protéique assemblée au niveau du centromère de chaque chromatide sœur (Cheeseman and Desai, 2008) comprenant environ 80 protéines qui sont séquentiellement recrutées en différents complexes. La chromatine des centromères possède un variant de l'Histone H3, CENP-A (CENTromeric Protein A), qui est le point de départ de l'assemblage du kinétochore. En effet, en phase G2, CENP-A va permettre de recruter le complexe CCAN (Constitutive Centromere-Associated Network) qui servira lui-même, dès l'entrée en mitose, de plateforme au recrutement du réseau KMN, composé des sous-complexes KNL1 (Kinetochores NulL protein 1), Mis12 (MISsegregation 12) et Ndc80 (Nuclear division cycle 80). Ceci forme la face externe du kinétochore. Ndc80 recrute à son tour le complexe RZZ (Rod, Zw10 et Zwilch) qui s'associe avec le complexe Dynéine/Dynactine (Karess, 2005).

Le réseau KMN, en plus de son interaction avec les microtubules (Cheeseman et al., 2006), va également permettre de concentrer les protéines du point de contrôle au niveau des kinétochores non-attachés. En effet, la protéine Blinkin (orthologue humain de KNL-1) est capable de s'associer à Bub1 et BubR1 aux kinétochores, ce qui est requis pour leurs fonctions dans le SAC (Kiyomitsu et al., 2007). Le complexe KNL1, composé de KNL-1 et Zwint, est indispensable à la localisation du complexe RZZ au kinétochore qui lui-même recrute les protéines du point de contrôle du fuseau Mad1 et Mad2 (Buffin et al., 2005; Karess, 2005; Kops et al., 2005). D'autre part il a été montré que Hec1, l'orthologue humain de Ndc80p, est impliqué dans le recrutement de Mad1, Mad2 et Mps1 aux kinétochores (Martin-Lluesma et al., 2002) (figure 10).

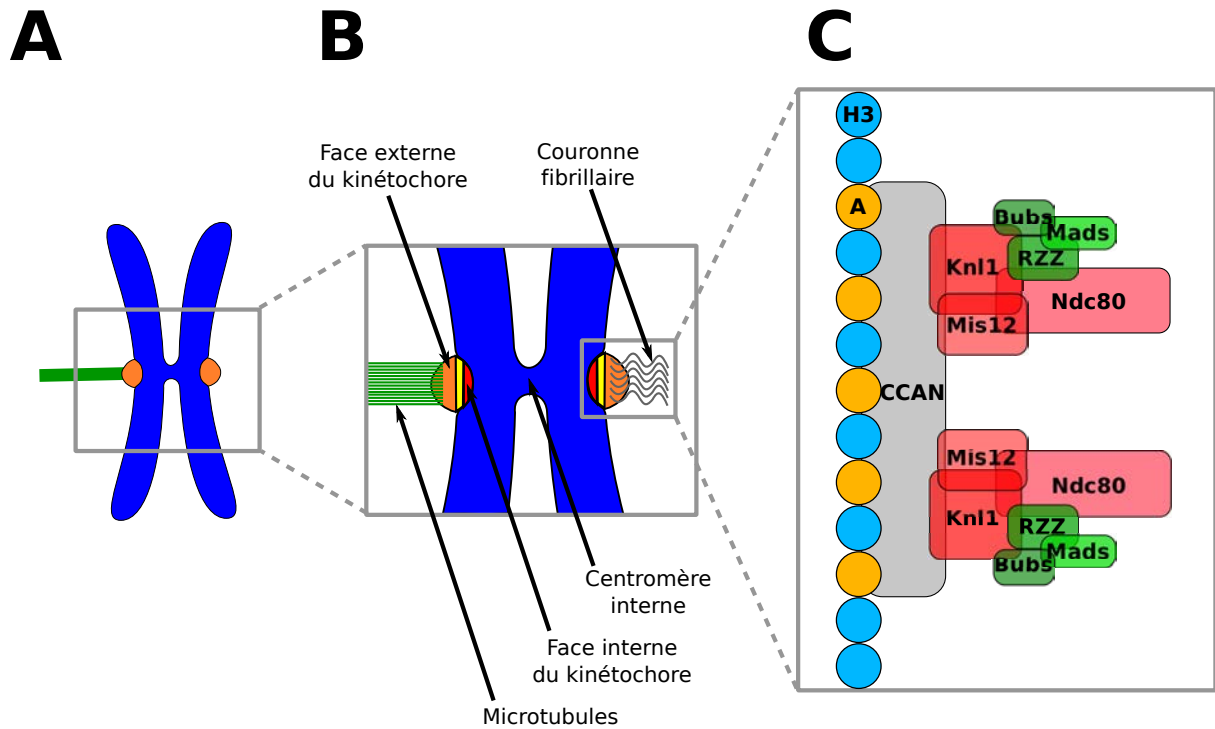


Figure 10 : La structure du kinétochore.

A. Schéma d'un chromosome où un seul des kinétochores est attaché aux microtubules. **B.** Schéma de l'ultrastructure des kinétochores avec les faces internes (rouge) et externes (orange), assemblées sur le centromère interne. Un kinétochore non attaché présente une couronne fibrillaire. **C.** Schéma des différents complexes protéiques associés au niveau des centromères des vertébrés. Le complexe CCAN (gris) représente le premier niveau architectural et est recruté aux centromères par la présence de nucléosomes contenant un variant de l'Histone H3 (bleu) appelé CENP-A (orange). Le complexe CCAN permet le recrutement du réseau KMN composé des complexes KNL1, MIS12 et Ndc80 (rouge). A son tour, ce réseau permet de recruter le complexe RZZ (vert) et les composants du SAC : Bub1, BuBR1 et Bub3 (Bubs, vert), et Mad1 et Mad2 (Mads, vert). Schéma inspiré de (Lara-Gonzalez et al., 2012).

Enfin, le dernier complexe majeur du kinétochore est le CPC (Chromosomal Passenger Complex), composé des protéines Aurora B, INCENP, Survivine et Boréoline. Sa localisation au centromère, indépendante du réseau KMN, est due à la liaison directe de la Survivine sur le résidu phosphorylé T3 de l'histone H3 (Wang et al., 2010) et à la phosphorylation de la Boréoline, qui s'associera avec la Shugoshine au niveau des histone H2A phosphorylé par Bub1 (Tsukahara et al., 2010). Aurora B a un rôle central dans la transition métaphase/anaphase : en phosphorylant MCAK et Ndc80, elle va favoriser la déstabilisation des microtubules mal attachés au kinétochore ; elle est également directement impliquée dans le point de contrôle.

2 – Les modes d'attachement et les corrections d'erreurs

L'attachement des kinétochores aux microtubules est séquentiel au cours de la prométaphase. En effet, les deux kinétochores des chromatides sœurs d'un même chromosome ne sont pas attachés exactement en même temps : avant que les deux kinétochores soient attachés chacun à leur pôle (attachement amphitélique), l'attachement est dit monotélique (un seul kinétochore attaché). Alors que dans le cas d'un attachement amphitélique le chromosome est biorienté, lorsque l'attachement est monotélique, le chromosome est mono-orienté. Dans certains cas, il est possible que le second kinétochore s'attache aux microtubules émanant du même pôle : l'attachement est dit syntélique. Enfin, si les deux kinétochores sont attachés, dont un simultanément aux deux pôles, l'attachement est dit mérotélique (Maiato et al., 2004a) (figure 11A).

Dans le cas d'un attachement mono-orienté (monotélique ou syntélique), des défauts de tension apparaissent et les microtubules (et donc les attachements) ne sont pas stabilisés (Hauf et al., 2003; Lampson et al., 2004; Liu et al., 2009). De plus, dans le cas d'un attachement monotélique, le kinétochore libre active le point de contrôle du fuseau. Cependant, la détection de l'attachement mérotélique pose davantage de questions : alors que les deux kinétochores sont attachés (le point de contrôle est donc satisfait (Cimini et al., 2001)) de façon bi-orientée (la tension est donc bidirectionnelle), ce type d'attachement est tout de même corrigé avant ou pendant l'anaphase (Cimini, 2007; Cimini et al., 2004; Cimini et al., 2003). Le point de contrôle étant satisfait, certaines cellules qui entrent en anaphase présentent des « lagging chromosomes » entre les deux lots d'ADN n'induisant pas d'aneuploïdie pour autant. La force exercée par les microtubules pourrait suffire à tirer la chromatide retardée du bon côté.

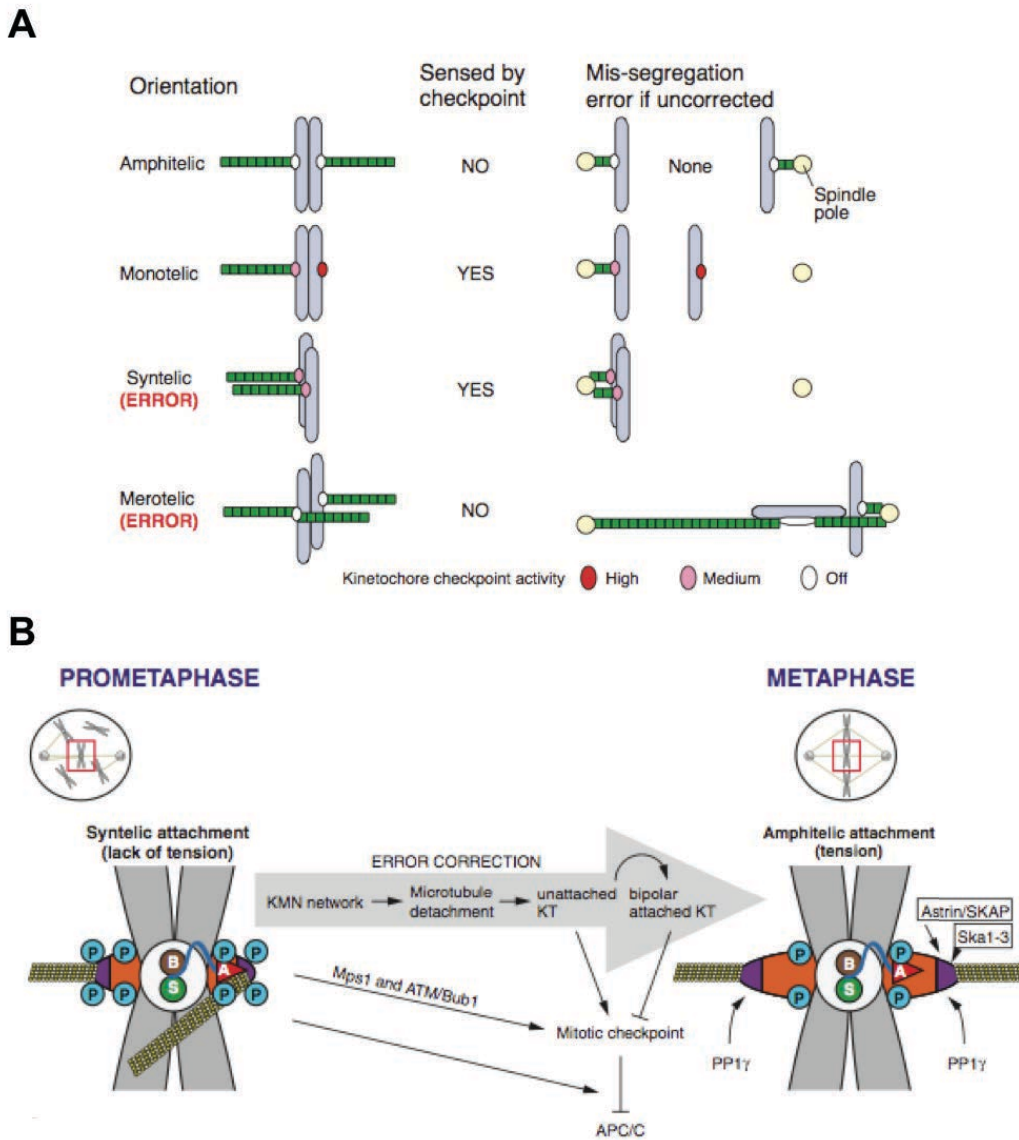


Figure 11 : Les modes d'attachement kinétochore-microtubules et le CPC.

A. Description des différents modes d'attachement kinétochore-microtubules, l'état d'activation du point de contrôle et les éventuels défauts de ségrégation si les erreurs ne sont pas corrigées. Dans le cas d'un attachement monotélique, l'activité du SAC est forte car un des kinétochores est libre (rouge). Pour les attachements syntéliques ou mérotéliques, l'activité du SAC est modérée (kinétochore rose) voire inexistante (kinétochore blanc) car les kinétochores sont attachés. Cependant, dans le cas d'un attachement syntélique, le défaut de tension suffit à corriger l'attachement alors que pour l'attachement mérotélique, la correction semble avoir lieu après la transition métaphase/anaphase. Schéma issu de (Maiato et al., 2004a) **B.** Le CPC est composé de quatre protéines : Aurora B (A rouge), la Boréoline (B marron), la Survivine (S vert) et INCENP (trait bleu). Sa localisation est restreinte aux centromères et par conséquent, son activité est localisée au proche voisinage des kinétochores. Ainsi, lors de défaut de tension, Aurora B phosphoryle différents substrats dans le réseau KMN (orange) ce qui va déstabiliser l'attachement, rendre le kinétochore libre et activer le SAC à nouveau. Lorsque l'attachement est amphitélique en métaphase et donc que la tension est suffisante, les substrats d'Aurora B ne sont plus dans son rayon d'action. Leur déphosphorylation par PP1 γ va finir de stabiliser l'attachement. Schéma issu de (van der Waal et al., 2012).

Le senseur de tension, qui permet de déstabiliser les mauvais attachements, est le CPC (Chromosome Passenger Complex) composé de la Survivine, la Boréoline, INCENP et la kinase Aurora B (van der Waal et al., 2012). Ce complexe est localisé au niveau des centromères jusqu'à la métaphase et son action est due à l'activité kinase d'Aurora B au proche voisinage des kinétochores. Dans le cas d'un attachement mono-orienté, la tension exercée est insuffisante et les substrats d'Aurora B (comme Dsn1, KNL-1 et Ndc80, tous membres du réseau KMN) se trouvent dans son rayon d'activité (Cheeseman et al., 2006; Liu et al., 2009; Welburn et al., 2010). Dans ce cas, la phosphorylation du réseau KMN réduit l'affinité de ces protéines avec les microtubules et tend à déstabiliser les attachements (Welburn et al., 2010). Lorsque l'attachement est amphitélique, les forces exercées sur les kinétochores séparent spatialement Aurora B de ses substrats (Lampson and Cheeseman, 2011) et la phosphatase PP1 γ , recrutée par le réseau KMN, déphosphoryle les substrats d'Aurora B, ce qui stabilise l'attachement (Liu et al., 2010) (figure 11B).

La stabilisation des attachements amphitéliques seraient également facilités par le recrutement d'Astrin, SKAP (Small Kinetochore-Associated Protein) (Schmidt et al., 2010) et le complexe Ska par le réseau KMN (Chan et al., 2012) (figure 12C). De plus, le CPC et particulièrement l'activité kinase d'Aurora B serait essentielle à l'activation de Polo au centromère et à la progression de la mitose (Carmena et al., 2012), à la phosphorylation de mDia3 qui a un effet déstabilisateur sur les attachements entraînant une tension incorrecte (Cheng et al., 2011). Enfin, Aurora B phosphoryle MCAK ce qui entraîne sa localisation au centromère et régule son activité de dépolymérisation (Lan et al., 2004).

3 – La régulation du point de contrôle

Que ce soit dans le cas d'attachement monotélique ou suite à l'action du CPC dans la correction d'un mauvais attachement, un kinétochore non attaché recrute les protéines du SAC qui génèrent un signal inhibiteur pour l'APC/C, ce qui bloque la progression en anaphase. Comme décrit dans la partie C-1, le réseau KMN permet le recrutement aux kinétochores de protéines du point de contrôle : Blinkin/KNL-1, phosphorylé par Bub1, permet de recruter au kinétochore Bub1 et Mad3/BubR1 (Kiyomitsu et al., 2007) sous la dépendance de Bub3 (Taylor et al., 1998) avec l'aide de la kinase Mps1 au moins chez *S. cerevisiae* et *S. pombe* (London et al., 2012; Shepperd et al., 2012). D'autre part, Ndc80/Hec1 recrute aux kinétochores Mad1 et Mad2 par l'intermédiaire du complexe RZZ (Buffin et al., 2005; Kops et al., 2005) et également Mps1 (Martin-Lluesma et al., 2002). Très récemment, il a été montré chez la levure que l'association de Mad1 au kinétochore requiert la phosphorylation de Bub1 par Mps-1 (London and Biggins, 2014).

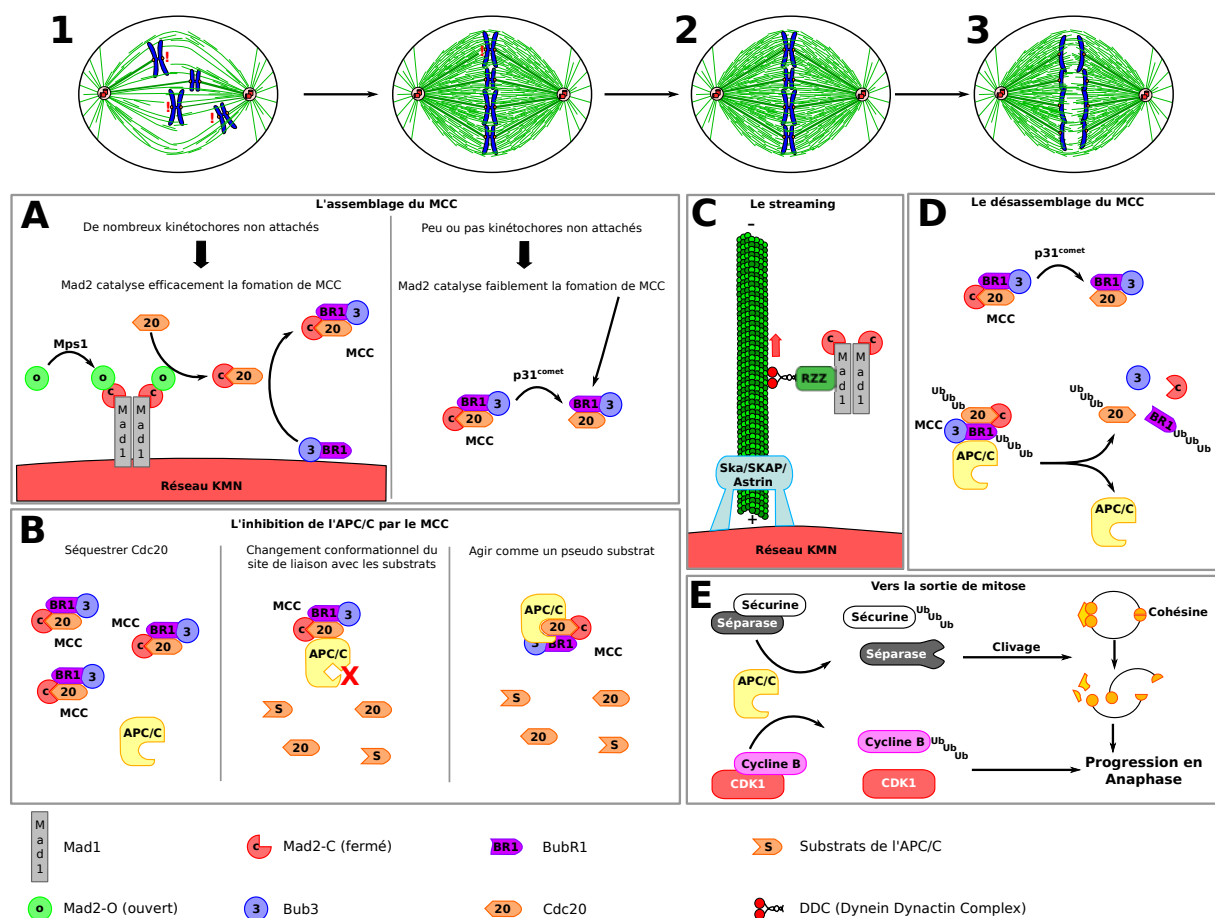


Figure 12 : La régulation du point de contrôle de l'assemblage du fuseau.

A. Lors de la prométaphase (1), La présence de kinétochores non attachés (point d'exclamation rouge) permet l'assemblage du MCC (Mad2, Cdc20, Bub3 et BubR1), l'inhibiteur de l'APC/C. Plus la cellule progresse dans l'assemblage du fuseau, moins les kinétochores sont libres. Mad2 devient limitant et un MCC dépourvu de Mad2 est assemblé. Ce complexe permettrait tout de même une inhibition basale de l'APC/C. **B.** Trois mécanismes permettent d'expliquer comment le MCC inhibe l'APC/C (voir le texte pour les détails). **C.** La cellule est dite en métaphase lorsque tous les attachements kinétochore-microtubules sont amphitéliques (2). Les complexes Mad1-Mad2-C qui forment la matrice d'assemblage du MCC sont alors retirés des kinétochores par le phénomène de streaming, impliquant le complexe RZZ et le DDC (dont l'activité motrice est dirigée vers les extrémités (-)). Notons qu'une structure composée de SKAP, Astrin et le complexe Ska (bleu ciel) stabilise les attachements. **D.** En parallèle, les complexes MCC sont désassemblés par l'action de $p31^{comet}$ et l'ubiquitylation de Cdc20 et BubR1. Ceci rend l'APC/C pleinement actif. **E.** Finalement, l'APC/C entraîne la dégradation de la cycline B et de la Sécurine, rendant la Séparase active pour cliver la Cohésine, ce qui permet à la cellule d'effectuer sa transition métaphase/anaphase.

Au niveau du kinétochore, Mad1 et Mad2 forment un complexe où Mad2 adopte une configuration fermée, appelée Mad2-C (Closed). Mad2 étant capable de dimériser, la forme ouverte de Mad2 (Mad2-O pour Open) se lie au complexe Mad1-Mad2-C et va capturer Cdc20, c'est la première étape de l'assemblage du MCC (Mitotic Checkpoint Complex) (De Antoni et al., 2005). Le recrutement de Mad2-O sur le complexe Mad1-Mad2-C semble être dépendant de l'activité kinase de Mps1 (Hewitt et al., 2010) : les auteurs proposent qu'étant capable de se dimériser et transphosphoryler, elle pourrait libérer le kinétochore et faciliter la liaison de Mad2-O sur le complexe Mad1-Mad2-C. Le complexe Mad2-C-Cdc20 va ensuite lier le complexe BubR1/Bub3 pour former le MCC (figure 12A, gauche).

Un nouveau modèle a été proposé selon lequel, un complexe BubR1-Bub3-Cdc20 serait capable de s'associer en l'absence de kinétochores non-attachés, résultant en une activité inhibitrice basale de l'APC/C. Mad2 catalyserait un changement conformationnel de Cdc20, permettant sa liaison avec BubR1 (Han et al., 2013). Dans ce modèle, BubR1-Cdc20 serait le réel inhibiteur de l'APC/C et Mad2 serait simplement un catalyseur de la formation du MCC aux kinétochores non-attachés, un catalyseur d'autant plus abondant que le nombre d'attachement est faible. Et finalement, p31^{comet} serait capable de décrocher Mad2 du MCC (Jia et al., 2011). L'activité inhibitrice de l'APC/C serait donc uniquement due à BubR1 (Kulukian et al., 2009; Westhorpe et al., 2011) (figure 12A, droite).

Trois mécanismes non exclusifs permettent donc d'expliquer comment l'APC/C est inactivé : (1) en diminuant la concentration de Cdc20 libre, (2) en se fixant à l'APC/C, le MCC pourrait bloquer la liaison des substrats en induisant un changement conformationnel, éloignant Cdc20 de l'APC/C (Chao et al., 2012), et (3) en agissant comme un pseudo-substrat en compétition avec les substrats réels de l'APC/C (Burton and Solomon, 2007; Izawa and Pines, 2012) (figure 12B).

Il est également important de noter que le CPC, et particulièrement l'activité kinase d'Aurora B pourrait aider au rapide établissement du point de contrôle en entrée de mitose par l'intermédiaire de Mps1 (Saurin et al., 2011) ; mais également plus en aval, Aurora B serait impliqué pour maintenir l'arrêt du cycle quand Mad1 est artificiellement maintenu au kinétochore correctement attaché (Maldonado and Kapoor, 2011).

En métaphase lorsque tous les kinétochores sont attachés aux microtubules du fuseau et/ou que la tension générée par ces attachements est correcte, le SAC est satisfait et la cellule peut entamer l'anaphase. La levée de l'inhibition de l'APC/C implique plusieurs mécanismes. Tout d'abord la phosphatase PP1 va antagoniser l'action d'Aurora B et déphosphoryler les substrats d'Aurora B (KNL-1, Ndc80 notamment) qui sont sortis de son rayon d'action suite à la tension exercée de part et

d'autre du centromère, mais également les substrats phosphorylés par d'autres kinase comme Mps1 et Plk1 (Mad1, Mps1 et BubR1 par exemple) (Lesage et al., 2011). Par le phénomène dit de « stripping », encore connu sous le nom de « streaming », le complexe Mad1-Mad2-C, associé aux complexes RZZ et Dynéine/Dynactine va être dissocié des kinétochores et amené vers les extrémités (-) des microtubules, donc vers les pôles (Basto et al., 2004; Howell et al., 2001; Karess, 2005) (figure 12C). Enfin, le désassemblage des complexes MCC permet de libérer Cdc20 qui pourra activer l'APC/C. Ce désassemblage semble être médié par un décrochage de Mad2 du MCC libre par p31^{comet} mais également par l'ubiquitinylation de Cdc20 et BubR1 qui pourrait déstabiliser les complexes MCC liés à l'APC/C (Lara-Gonzalez et al., 2012) (figure 12D).

Pour finir, une fois le point de contrôle éteint et l'APC/C activé, ce dernier va dégrader la Sécurine et la cycline B, ce qui va enclencher la sortie de mitose. En effet, une fois la Séparase libérée de son inhibition par la Sécurine, elle va cliver la Cohésine, ce qui provoque la perte de cohésion des deux chromatides sœurs (Lara-Gonzalez et al., 2012) (figure 12E).

III - Le neuroblaste de Drosophile

Lors du développement, les événements de division cellulaire et différenciation sont coordonnés pour déterminer le nombre de cellules, leur spécificité et leur organisation. Cette diversité cellulaire est un prérequis indispensable pour le développement d'organismes pluricellulaires et des différents organes et tissus qui les composent. L'homéostasie d'un tissu dépend donc en partie de l'équilibre entre prolifération et différenciation. Pour cela, la division cellulaire doit être contrôlée dans le temps et dans son orientation. En effet, au cours des deux dernières décennies il a été amplement étudié, et admis par la communauté scientifique, que l'orientation de division est un mécanisme fondamental pour coordonner la division cellulaire avec les différents destins cellulaires, l'architecture et la morphogénèse des tissus. Afin de générer de la diversité, certaines cellules se divisent donc asymétriquement, ce qui permet la ségrégation différentielle de déterminants d'identité cellulaire, définissant ainsi les destins cellulaires des deux cellules filles.

Parmi différents modèles comme l'embryon précoce du nématode *C. elegans*, l'épiderme et le neuroépithélium des mammifères, le neuroblaste de Drosophile a été largement étudié pour la compréhension de la polarité cellulaire, l'orientation du fuseau, la ségrégation des déterminants d'identité cellulaire. Cette dernière régule en fait la balance auto-renouvellement/différenciation et donc l'homéostasie du tissu, qui est altérée lors de pathologies du développement ou de cancers. La

division du neuroblaste étant fortement stéréotypée, elle en fait un modèle de choix pour l'étude de l'auto-renouvellement des cellules souches et la tumorigénèse.

Dans ce chapitre, je présenterai d'abord la polarité cellulaire et l'asymétrie de division, pour le neuroblaste de *Drosophile*. Dans un second temps, je détaillerai comment l'orientation de division, en ségrégeant asymétriquement les déterminants d'identité cellulaire, va jouer sur la balance auto-renouvellement/différenciation et donc sur l'homéostasie du système nerveux centrale larvaire de la *Drosophile*.

A - Polarité cellulaire et asymétrie de division

La polarité cellulaire est une caractéristique essentielle au développement des métazoaires et est impliquée par exemple dans la différenciation neuronale ou la morphogénèse des épithéliums (Suzuki and Ohno, 2006). L'établissement de la polarité est également un prérequis nécessaire à la mise en place de la division asymétrique, un processus qui permet de générer deux cellules filles différentes. Les protéines impliquées dans la polarité sont conservées à travers les espèces et permettent, selon différentes voies, d'orienter le fuseau mitotique (Morin and Bellaïche, 2011) et donc de ségréger différenciellement les déterminants d'identité cellulaire.

1 - Le neuroblaste et sa polarité

a) Les différents types de neuroblastes

Les neuroblastes post-embryonnaires du système nerveux central (SNC) larvaire sont issus des neuroblastes embryonnaires qui dérivent du neurectoderme ventral. Après une phase de prolifération lors de l'embryogénèse, les neuroblastes entrent en quiescence puis démarrent la seconde vague de prolifération au stade larvaire L1. Une phase de prolifération intense qui dure jusqu'à la pupaison, puis ralentit jusqu'à un arrêt quasi-total une journée après le début du stade pupal (Ito and Hotta, 1992). Différents types de neuroblastes, selon leur lignage, constituent le SNC larvaire. Les neuroblastes de type I sont majoritaires, ils se divisent asymétriquement en une grosse cellule qui conserve l'identité neuroblaste et une petite cellule appelée GMC (Ganglion Mother Cell) qui se divise à son tour en deux neurones différenciés (figure 13B, gauche). Les neuroblastes de type II ont un lignage qui vise à amplifier le nombre de GMC et donc de neurones générés. Ces neuroblastes se trouvent uniquement dans la région médiane dorso-postérieure du cerveau central et se divisent en une grosse cellule qui reste un neuroblaste et une petite cellule appelée INP (Intermediate Neural Precursor) qui se divise asymétriquement en un INP et une GMC.

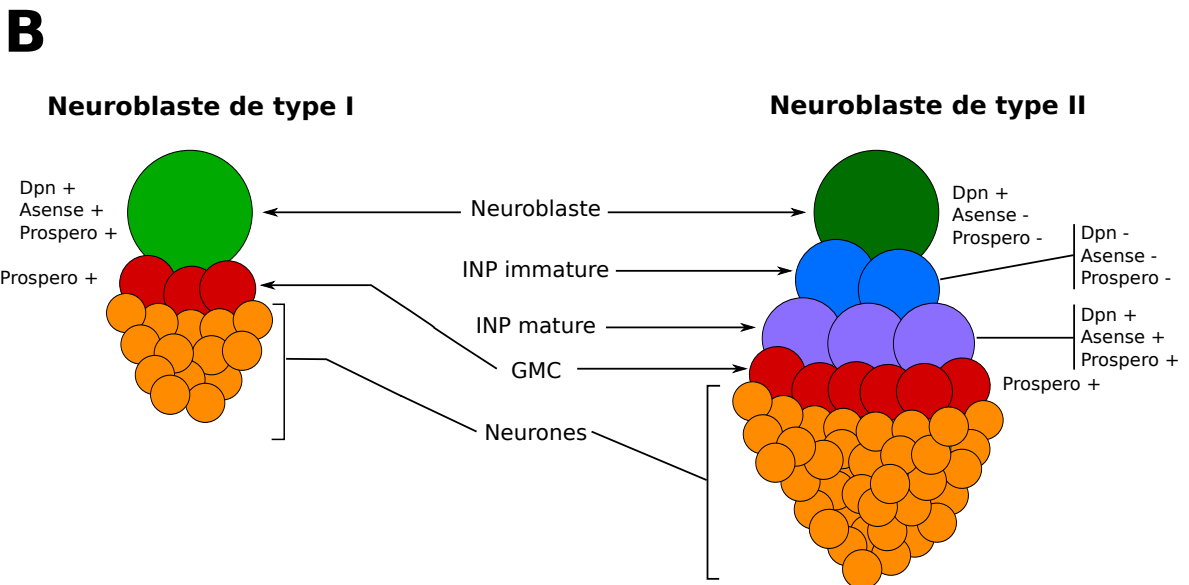
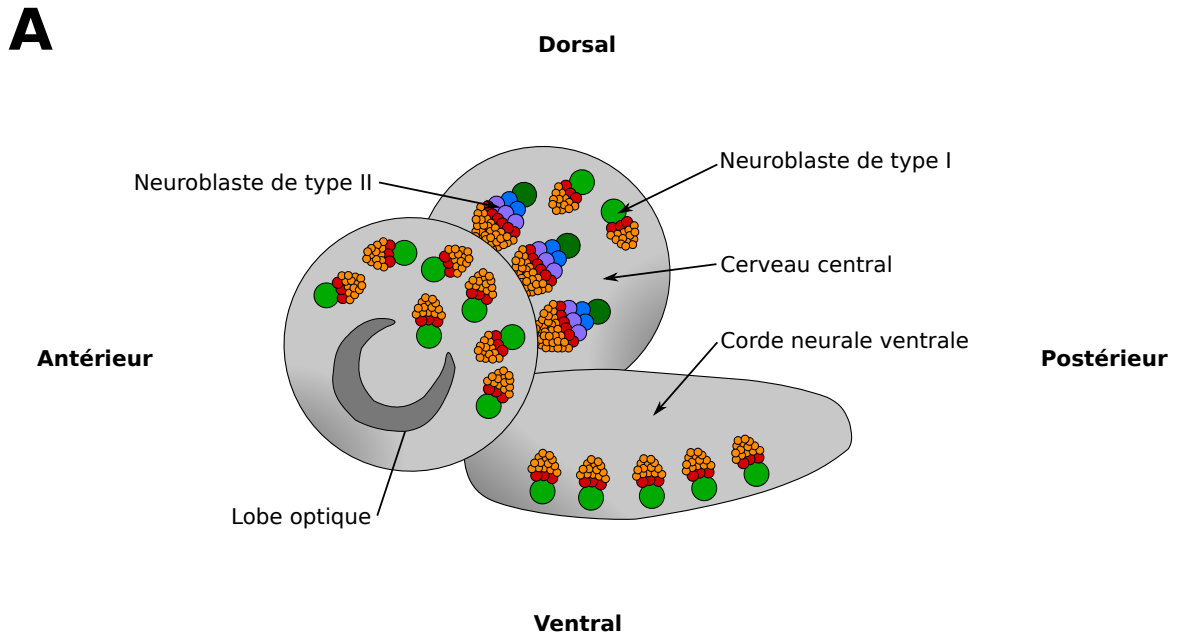


Figure 13 : Le système nerveux central larvaire et les types de neuroblastes.

A. Schéma du système nerveux central larvaire composé de deux lobes et la corde neurale ventrale.
B. Schéma du lignage des deux principaux types de neuroblastes. Le neuroblaste de type I (gauche, vert clair) se divise asymétriquement en un neuroblaste (auto-renouvellement) et une GMC (rouge) qui se divise à son tour en deux neurones (orange) (différenciation). Le neuroblaste de type II (droite, vert foncé) se divise asymétriquement en un neuroblaste et un INP, d'abord quiescent (bleu) puis mature lorsqu'il exprime Asense et Prospero à nouveau (violet). L'INP se divise asymétriquement en un INP et une GMC, qui se divise à son tour en neurone. Le neuroblaste de type II, contrairement au type I, n'exprime pas Asense et Prospero. Il contribue à former un plus grand nombre de GMC (et donc de neurones) qu'un neuroblaste de type I.

Les neuroblastes de type II n'ont pas de localisation basale de Prospero contrairement au type I, changeant le destin de la petite cellule, et n'expriment pas Asense. Ces INPs restent d'abord quiescents pendant quelques heures puis commencent à exprimer Asense, Dpn et Prospero : c'est la maturation (Bayraktar et al., 2010) (figure 13B, droite). Les auteurs de cette étude proposent un rôle central de Prospero dans la régulation de la prolifération des lignages des neuroblastes de types I et II. Les INPs expriment également la cycline E comme les neuroblastes et vont ségréger asymétriquement Pins (Partner of Inscuteable) en apical et Miranda et Prospero en basal. Cette cellule va se diviser en un INP et une GMC (Bello et al., 2008; Boone and Doe, 2008; Bowman et al., 2008). D'autres études ont montré l'importance de certains facteurs pour le potentiel développemental des INPs comme Earmuff (*erm*). Des mouches mutantes pour *erm* présentent des neuroblastes de type II ectopiques qui sont en fait le résultat d'une dédifférenciation des INPs. Cette protéine semble promouvoir la sortie du cycle en activant Prospero (limitant la prolifération) et antagonisant la voie Notch (ce qui empêche la dédifférenciation) (Weng et al., 2010). Enfin, le facteur de transcription Pointed, spécifique du lignage des neuroblastes de type II, exprimée ectopiquement dans les neuroblastes de type I entraîne une perte de l'expression d'Asense et la formation de pseudo-INPs. A l'inverse, sa déplétion réduit le nombre d'INPs et de GMCs (Zhu et al., 2011). Ce facteur de transcription semble donc nécessaire et suffisant pour supprimer l'expression d'Asense dans les neuroblastes de type II et pour la génération des INPs.

D'autres neuroblastes relatifs au type I existent au niveau des « mushroom bodies » (Ito and Hotta, 1992) et des lobes optiques (Egger et al., 2007; Egger et al., 2010). Dans ces deux études, Egger et collaborateurs ont montré que des cellules issues du neuroépithélium (en expansion par des divisions symétriques) vont changer leur axes de division, jusque là planaire, pour un axe orthogonal et donc se diviser asymétriquement suivant l'axe apico-basal. Une vague d'expression de gènes proneuraux qui inhibe la voie Notch de façon transitoire semble entraîner le changement entre division symétrique et asymétrique.

b) La polarité apico-basale

Quelque soit le type de neuroblastes, à l'exception de différences pour quelques marqueurs comme Asense et Prospero, la polarité et les protéines impliquées sont identiques. Cette polarité est le résultat de la localisation asymétrique de protéines de polarité qui définissent un pôle apical et un pôle basal. A l'issue de la division, les protéines associées au pôle apical seront retenues par le neuroblaste et celles associées au pôle basal seront délivrées dans la petite cellule (GMC ou INP selon le type de neuroblaste).

Le complexe Par (pour PARTitioning defective) identifié dans l'embryon de *C.elegans* (Kemphues et al., 1988) est composé de Par6, Par3/Bazooka et aPKC (atypical Protein Kinase C) (figure 14) et définit le pôle apical du neuroblaste dès la fin de l'interphase/début de prophase. Il a été montré que Bazooka permet la localisation apicale d'Inscuteable (Schober et al., 1999; Wodarz et al., 1999) et que Par6 semble requise pour la localisation de Bazooka (et par extension d'Inscuteable) dans les neuroblastes embryonnaires (Petronczki and Knoblich, 2001). C'est la localisation d'Inscuteable qui semble directement lier la polarité cellulaire et l'orientation du fuseau. En effet, la perte de fonction d'Inscuteable va provoquer une orientation aléatoire du fuseau des neuroblastes embryonnaires et à l'inverse, une expression ectopique le réoriente. De plus, sa déplétion entraîne également une délocalisation de Numb et Prospero, normalement basale (Kraut et al., 1996). Le module d'orientation du fuseau qui interagit avec Inscuteable sera décrit dans partie II-A-2. De façon surprenante, la perte de fonction d'aPKC dans les neuroblastes larvaires n'affecte pas la localisation Bazooka, Inscuteable et Dlg (Discs large, composant du module d'orientation du fuseau) mais délocalise Lgl (Lethal Giant Larvae), Par6 et Miranda (Rolls et al., 2003). Lgl est capable de former un complexe avec Par6 et aPKC, indépendamment de Par3 (Yamanaka et al., 2003), ce qui rend le complexe Par inactif (Wirtz-Peitz et al., 2008). Lors de la perte de fonction d'un membre du complexe Par, la polarité cellulaire est compromise, même si au moins dans le cas d'aPKC, ceci n'influe pas sur l'orientation du fuseau.

Au pôle basal (figure 14B) sont concentrés les déterminants d'identité cellulaire, exclus du cortex apical par la présence des protéines décrites précédemment. La kinase aPKC phosphoryle Miranda et l'exclue du cortex apical (Atwood and Prehoda, 2009). Miranda va servir de plateforme pour concentrer au pôle basal les protéines Brat (Brain tumor) (Lee et al., 2006b) et Prospero (pour les neuroblastes de type I) (Ikeshima-Kataoka et al., 1997; Matsuzaki et al., 1998). Les déplétions de Brat et Prospero engendrent les mêmes phénotypes : une prolifération incontrôlée dans le cerveau central (Bello et al., 2006; Betschinger et al., 2006; Lee et al., 2006b). Dans le cas du neuroblaste larvaire, il semble que les niveaux d'expression de Prospero et Brat soient co-dépendants (Betschinger et al., 2006) et l'expression ectopique de Prospero dans un mutant Brat peut sauver le phénotype de surprolifération (Bello et al., 2006). Ces trois études montrent que Brat et Prospero participent au contrôle de la prolifération cellulaire en inhibant le potentiel d'auto-renouvellement et en favorisant la différenciation dans les GMC. Numb, qui inhibe la voie de signalisation Notch-Delta qui semble favoriser l'auto-renouvellement des progéniteurs (Wang et al., 2006), est également ciblé vers le cortex basal par sa liaison avec PON (Partner Of Numb), dont la localisation basale est assurée par sa phosphorylation par la kinase Polo (Wang et al., 2007). Les auteurs suggèrent donc que dans le cas de pertes de fonction de PON ou Polo, Numb est ségrégué symétriquement et la GMC n'en reçoit

pas une quantité suffisante à l'issue de la division pour inhiber la voie Notch. Ceci résulterait en l'acquisition d'un destin cellulaire prolifératif pour cette pseudo-GMC.

L'état de phosphorylation de certaines protéines citées précédemment va avoir un effet important pour leur localisation et donc la polarité de la cellule (figure 14B). La kinase Polo comme décrit dans le paragraphe précédent phosphoryle PON ce qui est indispensable pour son adressage au cortex basal (Wang et al., 2007). Il est également important de noter que la kinase Polo est déterminante pour la localisation apicale d'aPKC, même si le lien entre ces deux kinases n'est pas expliqué. De plus, la phosphorylation de Numb par aPKC est essentielle pour exclure Numb du pôle apical en cellules épithéliales humaines (Smith et al., 2007). Ceci pourrait amplifier le phénomène d'exclusion de Numb initié par l'adressage basal de PON suite à sa phosphorylation par Polo. La seconde kinase impliquée dans la polarité est Aurora A. Décrite comme un suppresseur de tumeur dans le cas particulier du neuroblaste, cette kinase inhibe l'auto-renouvellement et favorise la différenciation neurale (Wang et al., 2006). Aurora A participe à la localisation d'aPKC, PON et Numb (Lee et al., 2006a; Wang et al., 2006; Wirtz-Peitz et al., 2008). Wirtz-Peitz et collaborateurs ont également montré qu'Aurora A phosphoryle Par6, ce qui active aPKC qui a son tour exclue Lgl du cortex apical. Les auteurs proposent un modèle selon lequel Bazooka rejoint Par6 et aPKC suite à la phosphorylation de Lgl par aPKC et son exclusion (figure 14A). Ceci change l'affinité de substrat d'aPKC qui phosphoryle alors Numb pour l'exclure du pôle apical. Aurora A, en excluant Numb du pôle apical, va activer la voie Notch dans le futur neuroblaste, ce qui maintient son pouvoir prolifératif. Enfin, Aurora A régulerait également la localisation de Mud (Mushroom body defect) qui influe directement sur l'orientation de division par sa liaison à la Dynéine (Wang et al., 2006). La phosphatase PP2A (Protein Phosphatase 2A), est composée de trois sous unités : Mts (Microtubule star, la sous unité catalytique), PP2A-29B et Twins. Elle a également pour rôle d'inhiber la prolifération cellulaire et de réguler la localisation de PON, Numb, Miranda et aPKC (Chabu and Doe, 2009; Ogawa et al., 2009; Wang et al., 2009). De plus, elle induit l'expression de Polo, indispensable à la localisation de Numb en basal (Wang et al., 2009). Il a également été montré que PP2A va déphosphoryler Par6 (phosphorylé par Aurora A) et donc négativement réguler aPKC (Ogawa et al., 2009). Ceci balance certainement l'effet de la phosphorylation d'Aurora A dans l'établissement du pôle apical et permet de le limiter dans l'espace, participant donc au contrôle de la prolifération cellulaire. Cette phosphatase est également impliquée dans le blocage précoce de la transition neuroépithélium-neuroblaste au niveau des lobes optiques (Chabu and Doe, 2009). Enfin, PP2A antagonise la phosphorylation de Bazooka par Par1. En effet, la perte de fonction de PP2A entraîne une inversion de polarité des neuroblastes embryonnaires, phénotype observable après la surexpression de la kinase Par1 (Krahn et al., 2009).

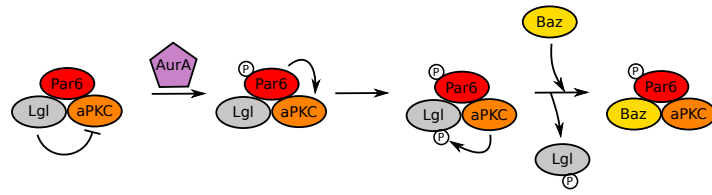
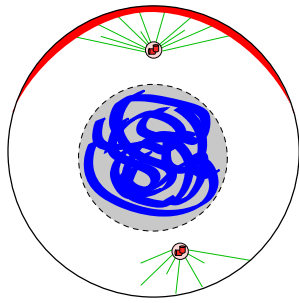
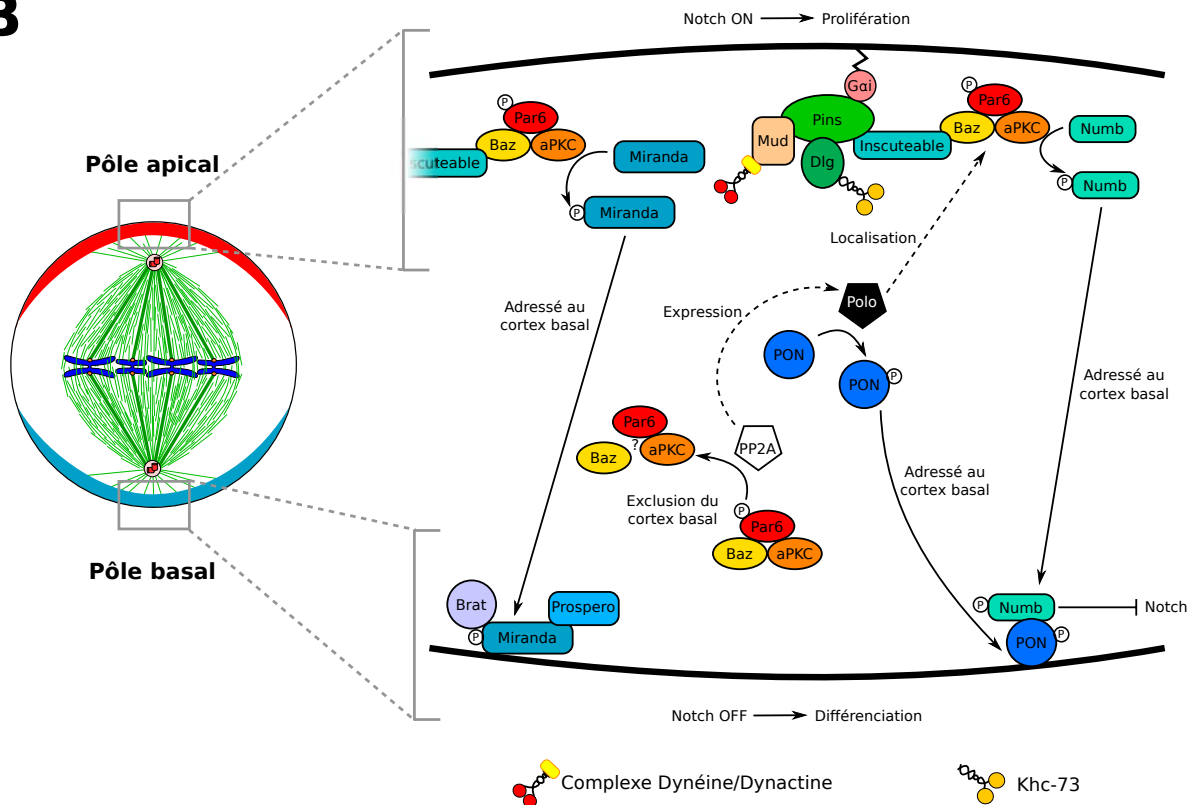
A**B**

Figure 14 : La polarité apico-basale du neuroblaste.

A. Etablissement de la polarité apicale. En fin d'interphase/début de prophase, Aurora A phosphoryle Par6, ce qui active aPKC qui phosphoryle à son tour Lgl, alors exclu du complexe. Bazooka (Baz) remplace Lgl : le complexe Par est formé. **B.** La polarité apico-basale. Inscuteable se fixe à Baz et recrute derrière lui Pins, Mud et Dlg. Pins lie également Gαi se qui permet l'ancrage au cortex de ce module. La phosphatase PP2A, en antagonisant la phosphorylation de Par6 par Aurora A, va permettre de limiter le croissant apical dans l'espace. Pins est la plateforme nécessaire à l'orientation du fuseau : Dlg, avec Khc-73 établit les contacts entre le cortex et les microtubules astraux alors que Mud et le DDC exerce les forces nécessaires à l'orientation du fuseau. aPKC phosphoryle Numb et Miranda, ce qui les adresse au pôle basal par exclusion du pôle apical. Polo (dont l'expression est activée par PP2A) phosphoryle PON, ce qui est requis pour sa localisation basale. Polo agit également sur la localisation apicale d'aPKC. Miranda recrute Brat et Prospero (neuroblaste de type I) au cortex basal et PON y recrute Numb. Numb inhibe la voie Notch en basal et favorise donc la différenciation.

2 - L'orientation et l'ancrage du fuseau

a) La polarité dicte l'orientation du fuseau

De *C. elegans* aux mammifères en passant par la *Drosophile*, quelques soient les protéines impliquées dans la polarité de la cellule, toutes convergent remarquablement vers la famille de protéine LIN-5/Mud/NuMA (chez le nématode, la drosophile et les mammifères respectivement) et le complexe Dynéine-Dynactine pour orienter le fuseau lors de divisions asymétriques (Morin and Bellaïche, 2011).

Comme décrit dans la partie précédente, le complexe Par et particulièrement Bazooka recrute Inscuteable au pôle apical. Inscuteable s'associe à Pins (Partner of Inscuteable), également impliqué dans l'orientation du fuseau et le maintien de la polarité cellulaire (Schaefer et al., 2000). Dans cet article, les auteurs établissent également le lien physique entre Inscuteable, Pins et une des sous-unité d'une protéine G hétérotrimérique : $G\alpha_i$. Cette protéine est localisée au cortex apical sous l'influence du complexe Inscuteable-Pins et est également impliquée dans l'asymétrie de division et la polarité cellulaire des neuroblastes et des organes sensoriels (Schaefer et al., 2001). $G\alpha_i$ est une des trois sous-unités d'une protéine G et contrairement à son activité de signalisation où la forme effectrice est $G\alpha$ -GTP- $G\beta\gamma$ lorsqu'elle est couplée à un récepteur, son activité dans le positionnement du fuseau est due au complexe $G\alpha$ -GDP-Pins (Gonczy, 2008). Le complexe $G\alpha$ -GDP-Pins (GoLoco) apical va agir comme une plateforme à l'origine de deux cascades d'interaction de protéines pour réguler l'orientation du fuseau. La première repose sur la liaison de Mud (Mushroom body defect) à la partie N-terminale de Pins (domaine TPR pour Tetratricopeptide Repeat) et la deuxième à la liaison de Dlg à la région centrale de Pins (domaine Linker) (figure 14B).

L'orthologue de NuMA chez la *Drosophile*, appelé Mud est capable de s'associer avec Pins et $G\alpha_i$ et est localisé au pôle apical (et aux centrosomes, comme décrit précédemment). Sa déplétion entraîne des défauts d'orientation de division, conduisant à une surprolifération mais n'affecte pas la polarité cellulaire (Bowman et al., 2006; Izumi et al., 2006; Siller et al., 2006). En extrait de Xénope, il a été montré que NuMA est capable de s'associer avec la Dynéine, constituant un lien moléculaire entre le complexe de polarité et les microtubules astraux (Merdes et al., 1996). Dans les neuroblastes, bien que le complexe DDC ne soit pas particulièrement enrichi au cortex apical (Siller et al., 2005), la perte de fonction de la Dynactine (ou Lis1 pour Lissencephaly-1) affecte les oscillations et l'orientation du fuseau en métaphase. Par contre, cette mauvaise orientation du fuseau est sauvée en télophase et le fuseau est à nouveau orienté selon l'axe apico-basal (Siller and Doe, 2008). Ce phénomène baptisé « telophase rescue » a été observé en vidéomicroscopie et ne semble pas lié à un délai de la transition métaphase/anaphase dû à l'activation du SAC.

C'est la deuxième cascade d'interaction découlant de Pins qui pourrait expliquer le phénomène de « telophase rescue ». En effet en l'absence d'Inscuteable où l'interaction entre le complexe Par et les effecteurs de l'orientation du fuseau (Pins, Gai et Mud) est perdue, une cellule métaphasique va être capable d'adresser au cortex Pins, Gai et Dlg à un des pôles de la cellule, sous le contrôle des microtubules astraux. Plus précisément, les auteurs proposent que Khc-73, associée aux extrémités (+) des microtubules astraux, est capable d'interagir avec Dlg et dicte la formation d'un croissant Pins/Gai/Dlg au pôle apical (Siegrist and Doe, 2005). Cette cascade pourrait donc expliquer le phénomène de « telophase rescue » observé dans les mouches mutantes pour *mud*. De plus, cette étude est cohérente avec une publication de 2010 affirmant que c'est l'aster apical qui dicte l'orientation du fuseau (Januschke and Gonzalez, 2010). Une étude a permis de détailler la voie Khc-73/Dlg/Pins. Pour cela, les auteurs ont élaboré des protéines de fusion entre la molécule d'adhésion homophile Echinoïde et des protéines aPKC, Pins ou Dlg, en pleine longueur ou tronquées, avec des traitements variés par ARNi. Lorsqu'elles sont transfectées en cellules S2, ces protéines de fusion sont restreintes à la zone de contact entre deux cellules, induisant une polarité. Ils ont montré dans ce système que les domaines Nterminal (TPR) et central (Linker) agissent en synergie pour orienter le fuseau et que le domaine « Linker » est phosphorylé par Aurora A. Cette phosphorylation est nécessaire à l'association de Dlg. Ils ont également confirmé le rôle de l'interaction Pins(TPR)-Mud qui avec l'aide du DDC, améliore l'orientation du fuseau. Les deux voies n'induisant qu'une orientation partielle du fuseau, ils proposent que la voie Pins(Linker)-Dlg-Khc-73 fournirait un lien statique entre les microtubules astraux et le cortex ; et que la voie Pins(TPR)-Mud-DDC induirait les forces de traction nécessaires pour amener le centrosome proche du cortex (Johnston et al., 2009) (figure 14B).

Enfin, comme décrit dans la partie II-B-2-a, un grand nombre de protéines associées à l'extrémité (+) des microtubules, les +TIPs, font le lien entre les microtubules astraux et le cortex et sont donc fortement impliquées dans le positionnement du fuseau. Ainsi, de manière non spécifique aux neuroblastes, les protéines Msps/XMAP215 et CLASP participent à la stabilité des microtubules, EB1 cible CLIP170 et p150^{glued}-Dynactine à l'extrémité (+) des microtubules par leur domaines Cap-Gly, ce qui impacte la dynamique des microtubules, l'assemblage du fuseau, l'activation de la Dynéine et le positionnement des centrosomes. EB1 lie également les protéines contenant les domaines SxIP comme APC et Par1 et médie leurs interactions aux extrémités (+), ce qui influe sur la stabilité des microtubules, l'organisation des centrosomes, l'orientation du fuseau, la régulation et la maintenance de la polarité et la polymérisation locale de l'actine. Enfin, EB1 cible MCAK par son domaine SxIP à l'extrémité (+) des microtubules. MCAK va dépolymériser les microtubules et contrebalancer l'effet des protéines citées précédemment, ce qui pourrait être couplé à la

génération de forces corticales, nécessaires à l'orientation du fuseau (pour revue, (Lu and Johnston, 2013)).

b) La mémoire de l'orientation du fuseau lors de divisions successives

Dans la partie précédente, j'ai décrit comment la polarité corticale influence l'orientation du fuseau. Cependant lors de divisions successives de neuroblastes larvaires, les deux centrosomes sont approximativement positionnés selon l'axe apico-basal au moment de la rupture de l'enveloppe nucléaire (Rebollo et al., 2007; Rusan and Peifer, 2007) (figure 15A). Le fuseau ne subit que de légères oscillations en prométaphase et métaphase, parallèlement à son assemblage (Rusan and Peifer, 2007). Ceci est également vrai pour les neuroblastes embryonnaires, à l'exception de la première division après délamination qui présentent des centrosomes orthogonaux à l'axe de polarité et un fuseau qui exécute une rotation de 90° pendant la prométaphase (Kaltschmidt et al., 2000; Rebollo et al., 2009). Les deux études de 2007 ont également révélé un comportement stéréotypé des centrosomes : la séparation apparaît relativement tôt en interphase et dès lors, un des centrosomes garde le pouvoir de nucléation et reste associé au cortex apical durant tout le cycle cellulaire alors que le second centrosome, hautement mobile, ne nucléé pas ou peu de microtubules ; il rejoint la partie basale de la cellule et gagne son potentiel de nucléation quelques minutes avant la rupture de l'enveloppe nucléaire. En 2011, Januschke et collaborateurs dissèquent le cycle du centrosome du neuroblaste et découvrent qu'immédiatement après la cytokinèse, les deux centrioles se séparent (avant la duplication) et le centriole le plus âgé est ségrégué dans la GMC alors que le plus jeune est retenu par le neuroblaste (Januschke et al., 2011) (figure 15A). Ce résultat confirme une étude publiée en 2010 qui montre qu'en utilisant un marqueur GFP-PACT, qui marque plus intensément les centrioles les plus vieux, le centriole père est hérité par la GMC (Conduit and Raff, 2010). Un phénomène similaire avait été déjà observé dans la lignée germinale mâle de la *Drosophile*, à la différence que c'est le centrosome père qui est retenu dans la cellule souche (Yamashita et al., 2007).

Dans le neuroblaste, Polo (Rusan and Peifer, 2007), la Centrosomine (Conduit and Raff, 2010) et la Centrobine (Januschke et al., 2011) sont spécifiquement associées au centrosome fils tout au long du cycle alors que le centrosome père en est dépourvu pendant une partie de l'interphase (figure 15B). Ceci implique une régulation différentielle de la maturation des centrosomes. Deux études ont éclairci le phénomène. Il a tout d'abord été montré que la Centrobine, phosphorylée par Polo est suffisante pour permettre au centrosome fils de garder son pouvoir de nucléation. De plus, une protéine de fusion Centrobine-PACT, ectopiquement adressée au centrosome père, induit une nucléation par ce centrosome durant tout le cycle cellulaire (Januschke et al., 2013).

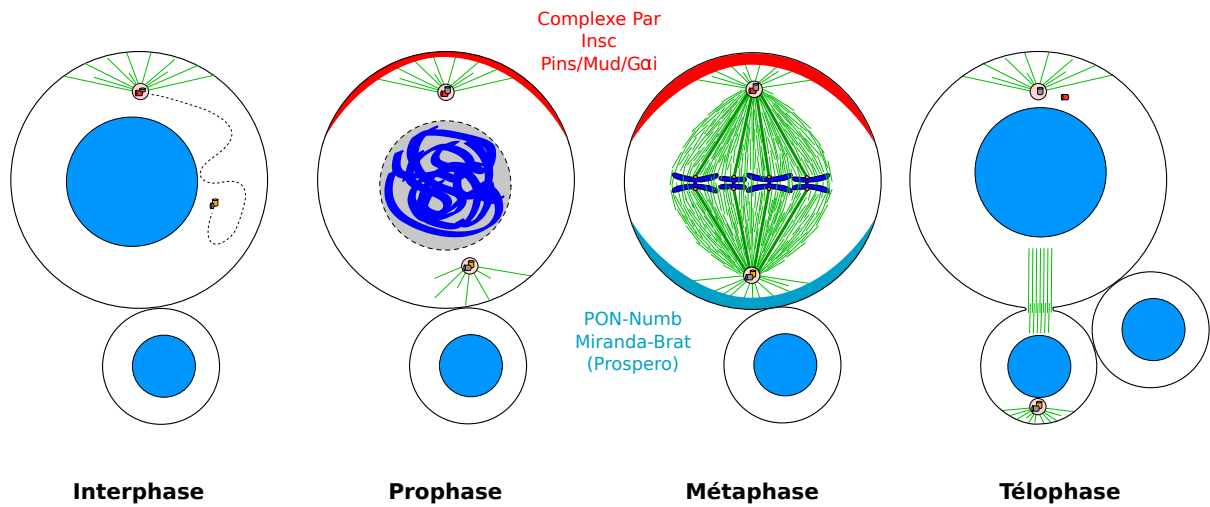
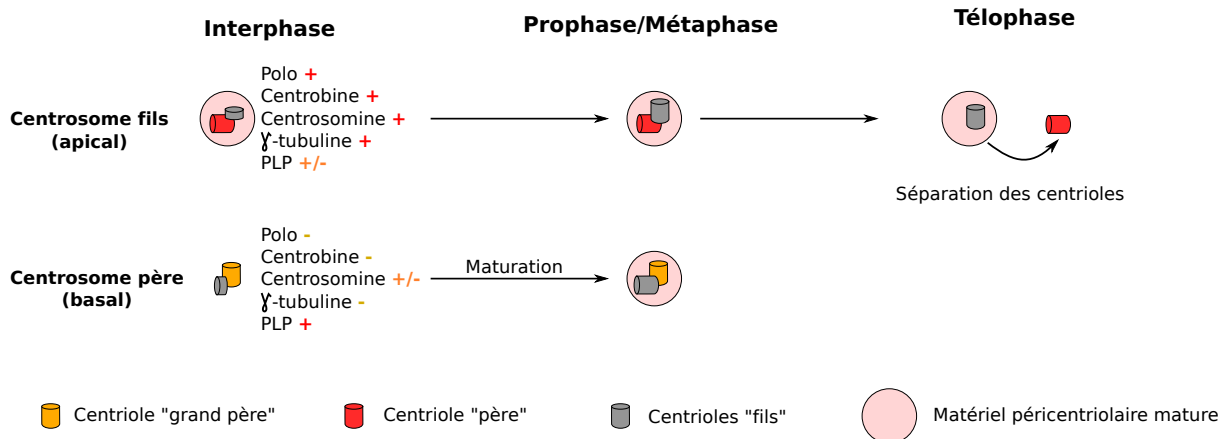
A**B**

Figure 15 : Le cycle du centrosome dans le neuroblaste larvaire.

A. En interphase, le centrosome fils garde son pouvoir de nucléation et reste associé au cortex apical, alors que le centrosome père est hautement mobile et ne nucléé pas ou peu de microtubules. Quelques minutes avant la prophase, le centrosome père se trouve dans la partie basale du neuroblaste. Il recrute alors le PCM et commence à nucléer des microtubules. A l'issue de la mitose, le centrosome père est hérité par la GMC et le centrosome fils par le neuroblaste. Dès la télophase, les centrioles se séparent. **B.** En interphase, le centriole père (rouge) et le centriole grand père (orange) sont déjà séparés et se dupliquent. Le centriole père est enrichi des protéines Polo, Centrobine, Centrosomine et γ -tubuline (centrosome fils) par rapport au centriole grand père qui est enrichi de PLP (centrosome père). Quelques minutes avant l'entrée en mitose, le centrosome père assemble un matériel péricentriolaire mature et est capable de nucléer des microtubules. En télophase, les deux centrioles du neuroblaste se séparent, le centriole fils reste apical alors que le centriole père perd son pouvoir de nucléation et devient mobile dans le cytoplasme.

A l'inverse, la protéine PLP (Pericentrin-Like Protein) est enrichi au niveau du centrosome père et a pour rôle d'empêcher la maturation trop rapide de celui-ci (figure 15B). En effet, des neuroblastes mutants pour *p/p* montrent des niveaux comparables de Polo et γ -tubuline entre les deux centrosomes. De plus, l'expression ectopique de Centrobine au centrosome père rend la distribution de PLP symétrique entre les deux centrosomes (Lerit and Rusan, 2013). Le pouvoir de nucléation du centrosome semble donc être régulé positivement par la Centrobine et négativement par PLP. Cependant, la relation entre la Centrobine, PLP et Polo n'est pas claire. Enfin il est important de noter que malgré quelques défauts d'assemblage du fuseau, de séparation des centrosomes en prophase et des centrosomes surnuméraires lors la déplétion de *p/p*, la division asymétrique n'est pas perturbée (Lerit and Rusan, 2013). Pour finir, Pins serait indispensable au pouvoir de nucléation du centrosome fils (Januschke et al., 2013; Rebollo et al., 2007). Malgré ces études, des zones d'ombres demeurent concernant les interactions fonctionnelles entre Polo, la Centrobine et PLP, mais également le rôle de Pins dans la nucléation du centrosome fils.

Même si la division asymétrique n'est pas bouleversée lorsque le cycle du centrosome est modifié (mutants *p/p* ou *centrobine*), il a été montré que le pouvoir de nucléation du centrosome fils est important pour le maintien de l'axe de division lors de mitoses successives (Januschke and Gonzalez, 2010). En dépolymérisant transitoirement les microtubules avec de la Colcémide pendant l'interphase, les deux centrosomes sont détachés du cortex et indiscernables. Lorsque la nucléation des microtubules est rétablie, les centrosomes dictent une nouvelle polarité qui conduit à une division indépendante de l'axe de la précédente. Sans nouvelle action de la Colcémide, cette nouvelle polarité restera permanente pour les prochaines divisions. Cette perte de fidélité de la polarité peut également être observée entre chaque cycle de neuroblastes mutants où les centrosomes sont altérés, lors de la perte de fonction de *sas-4*, *asl*, *pins* et *polo*. Le réseau de microtubule interphasique organisé par le centrosome fils semble donc requis pour la fidélité de l'orientation du fuseau d'une mitose à la suivante.

B - L'homéostasie du système nerveux central larvaire et ses dérèglements

De nombreuses protéines impliquées dans la polarité et l'orientation du fuseau sont indispensables à la division cellulaire asymétrique. Lors d'un dérèglement de la polarité cellulaire ou de l'orientation du fuseau, ceci peut mener à une division symétrique et exponentielle des neuroblastes, au détriment de la génération de cellules s'engageant vers la différenciation (Knoblich, 2010; Morin and Bellaïche, 2011). Ainsi, lors de la perte de fonction de Mud, l'orientation du fuseau

est aléatoire mais la polarité est inchangée ; donc, lorsque le fuseau est parfaitement orthogonal à l'axe apico-basal, les déterminants sont ségrégués symétriquement dans les deux cellules filles, donnant irrémédiablement naissance à deux neuroblastes. De même, dans le cas où le fuseau est orienté de façon oblique par rapport à l'axe apico-basal, si le pôle apical est hérité par les deux cellules filles, la division donnera deux neuroblastes, même si une seule des cellules filles hérite de tous les déterminants basaux. Seule une surexpression de Prospero permet d'induire la différenciation des cellules filles menant à une réduction importante du nombre de neuroblastes du SNC (Cabernard and Doe, 2009). Cette étude prouve donc que c'est le ratio des déterminants apicaux par rapport aux déterminants basaux qui spécifie l'identité neuroblaste ou GMC. Enfin, certains gènes requis exclusivement pour le lignage des neuroblastes de type II vont entraîner un surnombre dans la population des neuroblastes (Weng et al., 2010; Zhu et al., 2011). Le nombre de neuroblastes dans le tissu, le contrôle de leur lignage et de leur prolifération vont donc avoir un impact sur l'hémostase du tissu en contrôlant la balance entre auto-renouvellement et différenciation.

Le SNC larvaire constitue donc un modèle de choix pour étudier le dérèglement des cellules souches et l'effet tumorigène qui en découle. Caussinus et Gonzalez amènent la preuve de ce concept en 2005 : l'injection de morceaux de SNC larvaires mutants pour *pins*, *miranda*, *numb*, *prospero* ou *brat* dans l'abdomen de mouches sauvages va entraîner une surprolifération du greffon. Ces tumeurs peuvent donner des métastases et entraîner la mort de la mouche hôte (Caussinus and Gonzalez, 2005). Ils ont également montré que ces tumeurs immortalisées acquièrent au fur et à mesure une instabilité génétique et des altérations des centrosomes, deux caractéristiques tumorales absentes des tumeurs primaires. Il a été confirmé quelques années plus tard que cette instabilité génétique n'est qu'une conséquence de la transformation des cellules : en utilisant le même test, des greffons avec des mutations propices aux instabilités génétiques ne causent pas de croissance tumorale (Castellanos et al., 2008). Ce sont davantage les greffons portant des mutations entraînant des dysfonctionnements des centrosomes (*sas-4*, *asl*, *polo*, *aurA*, *sak* et *sas-6*) qui créent des tumeurs dans l'abdomen des mouches hôtes. Ces études montrent donc que c'est une rupture dans l'asymétrie de division des cellules souches qui va être causale pour la formation de tumeur dans le SNC de la Drosophile, et non l'aneuploïdie.

Comme suggéré précédemment, la voie Notch tend à promouvoir la prolifération des neuroblastes. Une étude publiée en 2011 montre qu'une augmentation de la signalisation Notch va promouvoir la croissance et la dédifférenciation des INPs en neuroblastes, ce qui peut être contrebalancé par la perte de fonction du facteur d'élongation 4E (eIF4E), spécifiquement pour les neuroblastes au comportement anormal. Ce facteur d'élongation est surexprimé dans les INPs

dédiérenciés et se trouve dans une boucle d'auto-amplification avec dMyc pour promouvoir la croissance cellulaire, menant à la génération de neuroblastes ectopiques (Song and Lu, 2011).

Le SNC larvaire de la Drosophile est donc un excellent modèle d'étude pour comprendre les rouages de la tumorigénèse par dérèglement de l'asymétrie de division ou du lignage des cellules souches. Cependant, il faut également noter que les mécanismes de polarité cellulaire et orientation du fuseau ont également participé à la compréhension du développement du système nerveux chez les mammifères et les désordres qui peuvent y être associés. En effet, lors du développement neural des mammifères, les cellules gliales subissent d'abord une phase proliférative par division symétrique planaire, suivie d'une phase neurogénique caractérisée par des divisions asymétriques. Lors de cette phase, l'orientation du fuseau n'est plus planaire et la division asymétrique donne naissance à deux cellules différentes : une cellule gliale et un neurone (neurogénèse directe), ou une cellule gliale et un précurseur intermédiaire (neurogénèse indirecte, qui ressemble au mode de division des neuroblastes de type I) ou encore une cellule gliale et une cellule gliale externe. Dans ce dernier cas, la cellule gliale externe peut se diviser asymétriquement en une nouvelle cellule gliale externe et un précurseur intermédiaire ; ceci ressemble fortement au lignage des neuroblastes de type II (Homem and Knoblich, 2012). De nombreux gènes impliqués dans l'orientation du fuseau sont donc mutés dans les pathologies du cerveau comme la microcéphalie, la lissencéphalie et la maladie de Huntington. A l'heure actuelle, il est cependant impossible de déterminer si les défauts d'orientation du fuseau sont la cause, un facteur aggravant ou une conséquence secondaire de ces maladies. En effet, la plupart de ces gènes associés à ces pathologies peuvent aussi jouer sur l'apoptose, le contrôle de la croissance cellulaire, la ségrégation des chromosomes, la ciliogénèse et d'autres phénomènes liés aux microtubules (transport intracellulaire ou migration cellulaire). De façon intéressante, ces processus sont également impliqués dans les cancers ou les maladies neurologiques (Noatynska et al., 2012).

IV - Objectifs de thèse

A l'heure actuelle, de nombreuses protéines sont connues pour leur rôle dans l'assemblage du fuseau ou son positionnement. Ces protéines, décrites pour des activités variées sur les microtubules, dressent un tableau de plus en plus précis des rouages de la mitose.

Lors de nombreuses études protéomiques, plusieurs centaines de protéines ont été identifiées sur la base de leur interaction plus ou moins directe avec les microtubules. Le point de départ de mon sujet de thèse repose sur un principe général. L'interaction de bon nombre de

protéines avec les microtubules reflète probablement une fonction. Ainsi la très grande majorité des régulateurs de l'assemblage du fuseau connus jusqu'à ce jour sont associés plus ou moins directement avec les microtubules. L'objectif de ma thèse était donc de mettre en évidence de nouvelles protéines régulant la dynamique des microtubules, l'assemblage du fuseau mitotique et/ou son orientation.

Pour cela, le laboratoire avait isolé avant mon arrivée 855 protéines associées aux microtubules au cours de l'embryogénèse de la Drosophile. Un crible par ARNi dans le système nerveux central larvaire visant à identifier de nouveaux régulateurs de la mitose, nous a permis de retenir 18 protéines. Au cours de ma thèse, j'ai étudié la fonction de l'une d'elles : MAP7/Ensconsine.

**Résultats - Caractérisation du rôle
d'Ensconsine/MAP7 dans la
dynamique des microtubules et des
centrosomes**

I - L'approche protéomique et le crible par ARNi

La première étape a été d'identifier par spectrométrie de masse l'interactome des microtubules de l'embryon de *Drosophila*. Des extractions protéiques d'embryons synchronisés entre 0 et 2 heures après la ponte (échantillon mitotique), et 2 et 17 heures après la ponte (échantillon interphasique) ont été supplémentés de GTP et Taxol, favorisant la polymérisation et la stabilité des microtubules. Après ultracentrifugation sur un coussin de glycérol, les microtubules et protéines associées sont dans le culot. Après spectrométrie de masse sur les deux culots, plus de 850 protéines ont été identifiées. Grâce aux nombres de peptides détectés pour chaque protéine (spectral counts), il est possible de quantifier l'abondance relative sur les microtubules mitotiques (échantillon 0-2 heures) par rapport aux microtubules en interphase (2-17 heures) de chacune des protéines. Les protéines identifiées ont pu être triées en trois catégories selon leur affinité pour les microtubules mitotiques et interphasiques. Sont considérées comme enrichies dans un échantillon, les protéines au moins cinq fois plus présentes dans un culot par rapport à l'autre. Ainsi, 187 protéines sont enrichies avec les microtubules interphasiques, 127 avec les microtubules mitotiques et 541 ne sont pas significativement enrichies dans l'un ou l'autre des échantillons.

En excluant les protéines spécifiquement enrichies en interphase, nous avons sélectionné pour le crible par ARNi, parmi 668 protéines, 96 gènes pour lesquels aucun rôle en mitose n'avait été caractérisé. Le crible, basé sur le système UAS-Gal4 (Brand and Perrimon, 1993), a été réalisé en croisant des *Drosophiles* femelles exprimant Gal4 spécifiquement dans le système nerveux central en plus d'un répresseur de Gal4 thermosensible avec des mâles issus de lignées commerciales exprimant la séquence d'ARNi sous le contrôle du promoteur UAS. La génération F1, d'abord entretenue à une température de 20°C était déplacée à 29°C, ce qui rend le répresseur de Gal4 inactif et donc l'ARNi efficace. Le changement de température était effectué au stade larvaire L1, permettant d'éviter une létalité trop précoce. Pour les 96 candidats, en plus de la létalité, trois types de phénotype étaient observés par microscopie suite à leur perte de fonction : (1) une hypercondensation des chromosomes qui est le signe d'un délai en mitose, (2) l'assemblage du fuseau mitotique et (3) l'orientation du fuseau par rapport à l'axe apico-basal. Parmi les 18 candidats, sélectionnés sur la base de leur interaction avec les microtubules et du phénotype mitotique, nous avons focalisé notre attention sur *Enscosine*.

II - La protéine Ensconsine

Ensconsine, également appelée E-MAP-115 ou MAP7, a initialement été découverte en 1993 et a été nommée E-MAP-115 de part son abondance dans les cellules épithéliales humaines en culture et pour sa masse moléculaire de 115 kDa (Masson and Kries, 1993). E-MAP-115 est dès lors caractérisée comme une MAP : elle décore les microtubules et sédimente avec des microtubules polymérisés à partir d'extraits cellulaires supplémentés en Taxol. Il est également mis en évidence dans cette étude que le domaine de liaison aux microtubules se situe en N-terminal de la protéine et que sa surexpression est suffisante pour bloquer l'effet du Nocodazole et stabiliser les microtubules. Parallèlement, cette même protéine a été identifiée sous le nom d'Ensconsine à cause de sa liaison forte aux microtubules et son possible rôle dans leur stabilité (Bulinski and Bossler, 1994). Le verbe « to ensconce » pourrait être traduit en français par « se caler » ou « s'installer confortablement ». En 1995, Masson & Kries montrent que l'association d'E-MAP-115 sur les microtubules varie au cours du cycle cellulaire : en prophase, son association aux microtubules est très faible puis elle augmente progressivement en même temps que la mitose progresse jusqu'à atteindre son plus fort niveau en interphase. Sa perte d'affinité semble être corrélée avec sa phosphorylation (Masson and Kries, 1995).

Quelques années plus tard, une nouvelle étude a été publiée, décrivant la dynamique d'Ensconsine *in vivo*. En utilisant la version pleine longueur ou seulement le N-terminal de la protéine, fusionnées à la GFP, les auteurs ont montré qu'Ensconsine s'associe dynamiquement avec la paroi des microtubules *in vivo* tout au long du cycle cellulaire, n'affectant cependant pas leur dynamique (Faire et al., 1999). Les auteurs proposent que l'effet stabilisateur décrit quelques années plus tôt soit simplement un artefact d'une surexpression trop forte. Enfin en 2011, une étude confirme en cellules humaines le rôle du domaine N-terminal dans la liaison avec les microtubules et le rôle de MAP7/Mdp3 dans la stabilité des microtubules après traitement par le froid ou au Nocodazole. Ils ont également montré que sa surexpression augmente la stabilité des microtubules (Sun et al., 2011).

Chez la souris, le KO d'E-MAP-115 n'est pas létal, certainement grâce à la présence de trois paralogues : MAP7 D1, 2 et 3. Cependant sa perte de fonction entraîne une stérilité des mâles, ce qui est en accord avec sa forte expression dans les testicules. Connue pour son association aux microtubules et son effet stabilisateur, ceci pourrait expliquer l'organisation anormale des microtubules dans les spermatides et les cellules de Sertoli, menant à la stérilité (Komada. et al., 2000).

Chez la *Drosophile*, deux domaines d'Enscosine/CG14998 présentent une plus grande similarité avec E-MAP-115 que le reste de la protéine. Ils ont été baptisés EHR (Enscosin Homology Region) 1 et 2, respectivement en N- et C-terminal. Le domaine EHR1 contient, comme chez les mammifères, le domaine de liaison aux microtubules. Dans les chambres ovariennes de *Drosophile*, Enscosine est impliquée dans la localisation de déterminants postérieurs et dorsaux comme Oskar, Staufén et Gurken mais également dans le positionnement du noyau de l'ovocyte. De plus, la perte de fonction d'Enscosine altère la localisation de la Kinésine-1 et de la Dynéine, normalement enrichie dans la partie postérieure de la chambre ovarienne. Les auteurs montrent également qu'Enscosine est requise pour l'association et la motilité de Kinésine-1 sur les microtubules. Enfin, la kinase Par-1 phosphoryle Enscosine, ce qui est requis pour la localisation polarisée au cortex antérieur et latéral-antérieur de l'ovocyte et pour la localisation apicale dans les cellules folliculaires (Sung et al., 2008).

Une seconde étude a également montré qu'Enscosine/MAP7 et la Kinésine-1/Kif5b sont requises pour le positionnement des noyaux dans les muscles transversaux de l'embryon de *Drosophile* mais également dans les myotubes de mammifères. Dans cette étude, les auteurs ont déterminé que la seconde région conservée, EHR2, était responsable de la liaison entre Enscosine et Kinésine-1 (Metzger et al., 2012). De plus, une construction chimère entre la partie N-terminale de Kif5b (principalement le domaine moteur de la kinésine) et la partie N-terminale de MAP7 (domaine de liaison aux microtubules) est capable de sauver le phénotype de défauts de migration des noyaux après de déplétion de MAP7. Chez la *Drosophile*, ce défaut de migration des noyaux est directement corrélé avec des problèmes de locomotion.

Enfin, une dernière étude a montré chez la *Drosophile* qu'Enscosine est absolument requis pour la fonction de Kinésine-1 dans le transport (en cellules S2 et neurones en culture) et dans les déplacements de microtubules les uns par rapport aux autres. En utilisant la motilité des mitochondries, et différentes versions tronquées ou pleines longueurs d'Enscosine et KHC (Kinesin Heavy Chain, chaîne lourde de la Kinésine-1), les auteurs proposent un modèle selon lequel, seul le domaine EHR2 d'Enscosine est requis pour les fonctions de la Kinésine-1. Il agirait en levant l'auto-inhibition de la kinésine (Barlan et al., 2013).

III - Les principaux résultats

Dans notre étude, nous avons montré qu'Enscosine est associée au fuseau mitotique chez la *Drosophile* et que sa perte de fonction par ARNi entraîne un défaut d'assemblage du fuseau (fuseau

courts) rendant le SAC indispensable à la viabilité jusqu'au stade adulte. Chez les lignées mutantes (létales au stade au pupal), les fuseaux sont également raccourcis et le temps de mitose est allongé. D'un point de vue fonctionnel, nous avons confirmé que ces phénotypes sont dus à un défaut de croissance des microtubules : la vitesse de polymérisation des microtubules, analysée par le suivi de comète EB1-GFP en neuroblastes, est ralentie chez le mutant. Et à l'inverse, sa surexpression allonge les fuseaux en cellules S2. Enfin, elle accélère la vitesse et la quantité de microtubules polymérisés de façon dose dépendante *in vitro*. Enscinsine est donc requise pour la croissance des microtubules et l'assemblage du fuseau.

De plus, des neuroblastes de larves mutantes pour *enscinsine* présentent un défaut de séparation des centrosomes au moment de la rupture de l'enveloppe nucléaire. En suivant les centrosomes entre deux mitoses successives, nous avons montré que ce phénotype est le résultat d'une mauvaise séparation des centrosomes en début d'interphase, ce qui résulte dans certain cas à un défaut de ségrégation des centrosomes entre les deux cellules filles. En effet, le centrosome fils garde le pouvoir de nucléation et est normalement hérité par le neuroblaste, ce qui n'est pas le cas dans les neuroblastes de larves mutantes pour *enscinsine*. Enfin, nous avons montré que la perte de fonction de *khc* entraîne le même phénotype, sans affecter la mitose (taille du fuseau et temps de division). Nous avons donc mis en évidence dans le neuroblaste de Drosophile un nouveau rôle pour le complexe Enscinsine-Kinésine-1 dans la séparation des centrosomes et leur cycle.

Ensconsin/Map7 promotes microtubule growth and centrosome separation in *Drosophila* neural stem cells

Emmanuel Gallaud,¹ Renaud Caous,¹ Aude Pascal,¹ Franck Bazile,² Jean-Philippe Gagné,⁴ Sébastien Huet,³ Guy G. Poirier,⁴ Denis Chrétien,² Laurent Richard-Parpaillon,¹ and Régis Giet¹

¹Cytoskeleton and Cell Proliferation, ²Tubulin and Interacting Proteins, and ³Spatio-temporal Regulation of Transcription, Biosit, Université de Rennes I, Centre National de la Recherche Scientifique, UMR 6290, 35043 Rennes, France

⁴Centre de Recherche du Centre Hospitalier Universitaire de Québec, Pavillon CHUL, Université Laval, Québec City, Québec G1V 0A6, Canada

The mitotic spindle is crucial to achieve segregation of sister chromatids. To identify new mitotic spindle assembly regulators, we isolated 855 microtubule-associated proteins (MAPs) from *Drosophila melanogaster* mitotic or interphasic embryos. Using RNAi, we screened 96 poorly characterized genes in the *Drosophila* central nervous system to establish their possible role during spindle assembly. We found that Ensconsin/MAP7 mutant neuroblasts display shorter metaphase spindles, a defect caused by a reduced microtubule polymerization rate and enhanced by centrosome ablation. In agreement with a direct effect in regulating

spindle length, Ensconsin overexpression triggered an increase in spindle length in S2 cells, whereas purified Ensconsin stimulated microtubule polymerization *in vitro*. Interestingly, *ensc*-null mutant flies also display defective centrosome separation and positioning during interphase, a phenotype also detected in kinesin-1 mutants. Collectively, our results suggest that Ensconsin cooperates with its binding partner Kinesin-1 during interphase to trigger centrosome separation. In addition, Ensconsin promotes microtubule polymerization during mitosis to control spindle length independent of Kinesin-1.

Introduction

During mitosis, the mitotic spindle plays a crucial role in ensuring the correct segregation of chromosomes. One of the principal challenges faced by the cell during mitosis is the assembly of a powerful microtubule (Mt)-based machine mediating the efficient segregation of sister chromatids within a few minutes. Because of their role in defining the plane of cell division, mitotic Mts are also essential for brain homeostasis, a process linked to asymmetric stem cell division (Causinus and Gonzalez, 2005; Wodarz and Näthke, 2007; Neumüller and Knoblich, 2009). The assembly of the spindle is complex and tightly regulated. The association of Mt-associated proteins (MAPs) with Mts and their subsequent dissociation play an essential role in mitotic spindle assembly. Mitotic spindle assembly and

chromosome segregation thus require the complex spatial and temporal regulation of MAPs (Gadde and Heald, 2004).

Many MAPs have been identified in various model organisms. These proteins can be classified into two main categories: motor and nonmotor proteins. Through their direct effects on Mt dynamics, Mt sliding, and cross-linking, these MAPs are involved in several steps in mitosis: centrosome separation and positioning, the attachment of Mts to kinetochores (Kts), bipolar spindle formation, chromosome motion, and cytokinesis (Walczak and Heald, 2008). Mt polymerization is promoted by MAPs, such as TOGp/MAP215/msps (Cullen et al., 1999; Tournebize et al., 2000; Cassimeris and Morabito, 2004), and Mts are organized into a fusiform structure by motor proteins (Sawin et al., 1992; Wittmann et al., 1998; Goshima et al., 2005). Spindle size is controlled by the coordinated regulation of Mt end-binding proteins, such as CLASPs, depolymerizing

Correspondence to Régis Giet: regis.giet@univ-rennes1.fr

Abbreviations used in this paper: CNS, central nervous system; dsRNA, double-stranded RNA; EHR, Ensconsin homology region; GMC, ganglion mother cell; Khc, kinesin heavy chain; Kt, kinetochore; LC-MS/MS, liquid chromatography/tandem mass spectrometry; MAP, Mt-associated protein; Mt, microtubule; Nb, neuroblast; NEBD, nuclear envelope breakdown; SAC, spindle assembly checkpoint; WT, wild type.

© 2014 Gallaud 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 3.0 Unported license, as described at <http://creativecommons.org/licenses/by-nc-sa/3.0/>).

Supplemental Material can be found at:
<http://jcb.rupress.org/content/suppl/2014/03/27/jcb.201311094.DC1.html>

kinesins, and the Mt minus end protein known as patronin (Gaetz and Kapoor, 2004; Maiato et al., 2004, 2005; Laycock et al., 2006; Goodwin and Vale, 2010).

This study focuses on Ensconsin/MAP7. We demonstrate, for the first time, the occurrence in *Drosophila melanogaster* neuroblasts (Nbs) of Ensconsin/MAP7-dependent interphase centrosome separation and spindle assembly pathways during mitosis.

Results and discussion

Ensconsin is a general MAP required for mitotic spindle assembly in the fly central nervous system (CNS)

We analyzed the *Drosophila* Mt interactome from 0–2-h-old embryos, which are characterized by rapid, synchronous cell divisions (mitotic embryos), with the goal of identifying new spindle assembly proteins. In parallel, we also investigated the Mt interactomes of older embryos (2–17 h old), in which most Mts have nonmitotic functions. Mt polymerization was induced by incubation with taxol, and the MAPs and Mts were harvested by centrifugation and resolved by SDS-PAGE (Fig. S1, A and B). We applied a high-throughput proteomics approach, leading to the high-confidence identification of 855 proteins in both samples (Fig. S1, C–E; and Table S2). Using spectral count, a semiquantitative measurement of protein abundance, we classified all the proteins identified as mitotic, general, or interphasic MAPs on the basis of their enrichment profiles (Materials and methods).

We investigated the possible role in spindle assembly *in vivo* of 96 poorly characterized genes by applying RNAi to the fly CNS (Table S3 and Fig. S1 F; Dietzl et al., 2007; Mummery-Widmer et al., 2009; Neumüller et al., 2011). The new putative mitotic genes identified by this approach (Fig. S1 G and Table S1) included *Ensconsin* (CG14998). We used *ensc* mutants to investigate the role of this gene in mitotic spindle assembly (Fig. 1 B, bottom). We used three known *Ensconsin* mutant alleles: *ensc* Δ C (C-terminal deletion), *ensc* Δ N (N-terminal deletion), and *ensc* Δ Null (full deletion, hereafter referred to as *ensc*; Sung et al., 2008). Western blot analyses showed all three mutant strains to have similar low levels of Ensconsin protein (see Fig. S3 A).

Ensc mutants had small brain lobes (Fig. 1 A) and a higher mitotic index ($1.2 \pm 0.5\%$ in wild-type [WT] brains and $2.6 \pm 1.0\%$ in *ensc* mutant brains; $n > 3,000$ cells, 6 brains), which suggests that *ensc* mutation caused a mitotic delay due to prolonged spindle assembly checkpoint (SAC) activation. We tested this hypothesis with the double knockdown of Ensconsin and the SAC protein Mad2 by RNAi, with confirmation of the depletion of the protein (Fig. S2 A). Kt/Mt attachment defects were revealed by the large numbers of lagging chromatids during anaphase in double RNAi (6/30 anaphases) but not in cells subjected to *mad2* or *ensc* RNAi ($n > 40$ anaphases; Fig. S2, B and C). In addition, flies producing double-stranded RNAs (dsRNAs) for either *Ensconsin* or *Mad2* were viable, whereas flies producing both these RNAs died. This indicates that the SAC is required to prolong mitosis and to correct deleterious Kt–Mt attachment.

Ensconsin and Kinesin-1 mutant Nbs display similar centrosome separation defects during interphase

A close examination of *ensc* mutant Nb spindles revealed that the centrosomes were not fully separated at prophase (Fig. 1 B, top; $n = 20/91$) and that metaphase spindles were shorter than WT spindles (Fig. 1 B, bottom; $n > 300$ spindles).

Time-lapse imaging of dividing Nbs producing a GFP-tagged β -tubulin showed the time between nuclear envelope breakdown (NEBD) and anaphase onset to be 6.1 ± 0.9 min in WT cells and 8.0 ± 1.2 min in *ensc* mutants, which is consistent with SAC activation (Fig. 1, C and D, top; and Videos 1–3). We also confirmed that mean spindle length was significantly shorter in *ensc* mutants ($8.2 \pm 0.7 \mu\text{m}$) than in the WT (10.7 ± 0.7 ; Fig. 1 D, bottom).

In *Drosophila* Nbs, unlike most cell types, the centrosomes split and start to separate immediately after cytokinesis (Rebollo et al., 2007; Rusan and Peifer, 2007). The daughter centrosome is immobile, retains Mt nucleation activity, and is connected to the apical cortex, whereas the mother centrosome displays weak Mt nucleation and migrates to the opposite side of the cell. The mother centrosome organizes a second aster shortly before mitosis. The daughter centrosome is therefore inherited by the Nb and the mother centrosome is inherited by the ganglion mother cell (GMC; Conduit and Raff, 2010; Januschke et al., 2011). The angle between the Mt asters before NEBD reflects the efficacy of centrosome separation. It was found to be abnormally low in *ensc* mutants (Fig. 1 E, top; and Fig. 1 F; see also Video 2), for which 14% of Nbs presented mispositioned asters during prophase (Fig. 1 E, bottom; and Video 3). The mother centrosome is not visible (by GFP-tubulin staining methods) before NEBD. We therefore imaged Nbs expressing YFP-labeled centrosomes and GFP-labeled Mts between two consecutive mitoses (Rebollo et al., 2007; Januschke and Gonzalez, 2010). Centrosome splitting after cytokinesis was normal in *ensc* mutants, but the separation was incomplete, resulting in the apparent separation defect detected before NEBD (Fig. 2 A, interphase; and Videos 4 and 5). We observed no monopolar spindle formation, which suggests that the machinery required to separate centrosomes at NEBD is functional (Tanenbaum and Medema, 2010). However, due to the late timing of separation, when the mother centrosome started to nucleate Mts at NEBD, it was often anchored to the apical cortex in place of the daughter centrosome and was therefore inherited by the Nb (8/25; Fig. 2 A and Video 5, green line).

Ensconsin is a coactivator of Kinesin-1 in interphase. We therefore investigated whether centrosome separation defects could be also detected after a loss of Kinesin-1 function (Sung et al., 2008; Metzger et al., 2012; Barlan et al., 2013). We found centrosome separation defects in *khc*²⁷/*khc*⁶³ mutant brains, which lead to a small angle between centrosomes at NEBD but have no effect on spindle assembly (Fig. 2, B–E; and Videos 6 and 7). Centrosome inheritance was randomized and, in 50% of subsequent mitoses, the daughter centrosome ended up in the GMC (Fig. 2 D, bottom). These data demonstrate that early centrosome separation after cytokinesis is a prerequisite for correct centrosome segregation, a process in which Ensconsin and Kinesin-1

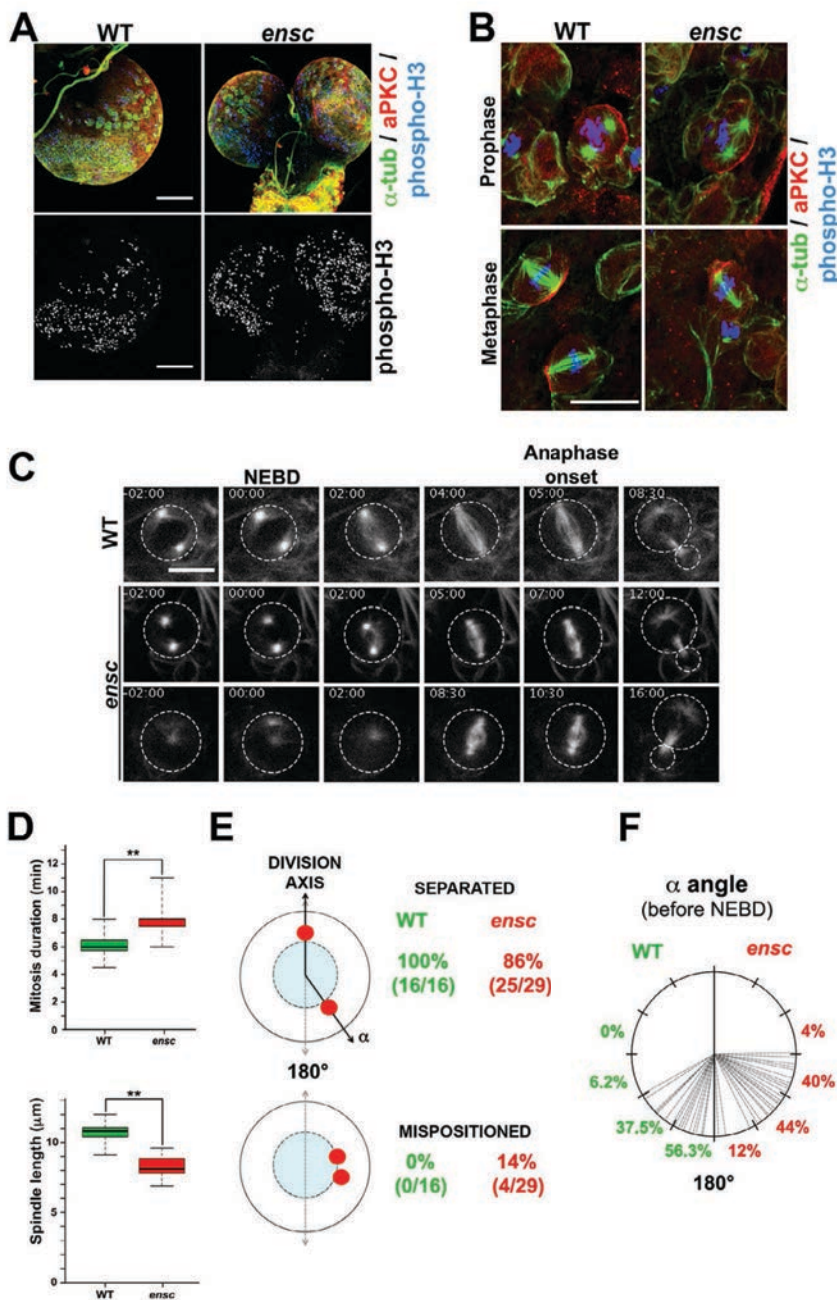


Figure 1. *ensc* mutant Nbs display centrosome separation defects and shorter metaphase spindles. (A) Overview of the optic lobes in WT and *ensc* mutant flies. *ensc* mutant larvae have small lobes and elevated numbers of mitotic cells. (B) Mitotic cells from WT or *ensc* mutant brains. A centrosome separation defect is detected in $\sim 15\%$ of the *ensc* mutant prophase cells (top). *ensc* mutant metaphase spindles are shorter (bottom) than those in WT Nbs. aPKC is shown in red, tubulin in green, and phospho-histone H3 Ser10 in blue (gray in the bottom of A). Bars: (A) 100 μ m; (B) 10 μ m. (C) Dividing WT (top and Video 1) and *ensc* mutant (middle and bottom, and Videos 2 and 3) Nbs expressing β -tubulin-GFP. Note the mitotic delay in the *ensc* mutant, the shorter spindles, and the centrosome-positioning defect (bottom). Time is given in minutes:seconds. 00:00 corresponds to NEBD. The circles indicate the contours of the cells. Bar, 10 μ m. (D) Analyses of the duration of mitosis (top) and spindle length (bottom) in WT (green) and *ensc* mutant (red) Nbs. Mitosis lasted 6.1 ± 0.9 min in the WT ($n = 23$) and 8.0 ± 1.2 min in the mutant ($n = 37$; **, $P = 1.10 \times 10^{-7}$). Spindle length was 10.7 ± 0.7 μ m in the WT ($n = 15$) and 8.2 ± 1.2 μ m in *ensc* mutants ($n = 23$; **, $P = 1.10 \times 10^{-7}$). (E) Analysis of centrosome separation in WT (green) and *ensc* mutant (red) Nbs at NEBD. 14% of *ensc* mutants display incomplete centrosome separation and severe mispositioning (Video 3). In the other cases (Video 2), the angle between the centrosomes relative to the center of the nucleus is measured (F). In WT, 93.8% of prophase cells have their basal centrosome oriented between 120° and 180° . In *ensc* mutants, only 56% of the cells position their centrosome in this region and 44% of the cells show an angle between 60° and 120° .

appear to be key players. Interestingly, spindle size and mitotic timing were normal in kinesin heavy chain (Khc)-depleted and mutant Nbs, which indicates a dependence of the short spindle phenotype on Enscinsin but not Kinesin-1 (Fig. 2 D).

Enscinsin is required for Mt growth in mitotic *Drosophila* Nbs

We analyzed the mitotic defects of the *ensc* mutants in detail by fully depolymerizing mitotic spindles from WT and *ensc* Nbs by cold treatment and monitoring Mt regrowth at 25°C (Fig. 3 A). In control tests, we observed large centrosomal asters 30 s after the return to 25°C conditions (Fig. 3 B, left, red arrows; $n = 19$).

We also detected asters around the main chromosome mass and discrete Kt fibers (Fig. 3 B, white arrows). At 90 s, the WT spindles had a normal, bipolar shape ($n = 25$). The *ensc* mutant Nbs displayed weak aster formation around the chromosomes and no obvious Kt fibers after 30 s ($n > 30$; Fig. 3 B, right). After 90 s, only short spindles with weak, disorganized Mt arrays were present ($n = 24$). Overall, our results suggest that Enscinsin contributes to the polymerization of spindle Mts. For confirmation of this role, we quantified Mt growth directly by tracking EB1-GFP comets at Mt plus ends in WT and *ensc* Nbs (Fig. 3 C and Video 8). Measurements of Mt dynamic parameters revealed that the mean rate of Mt polymerization was significantly lower

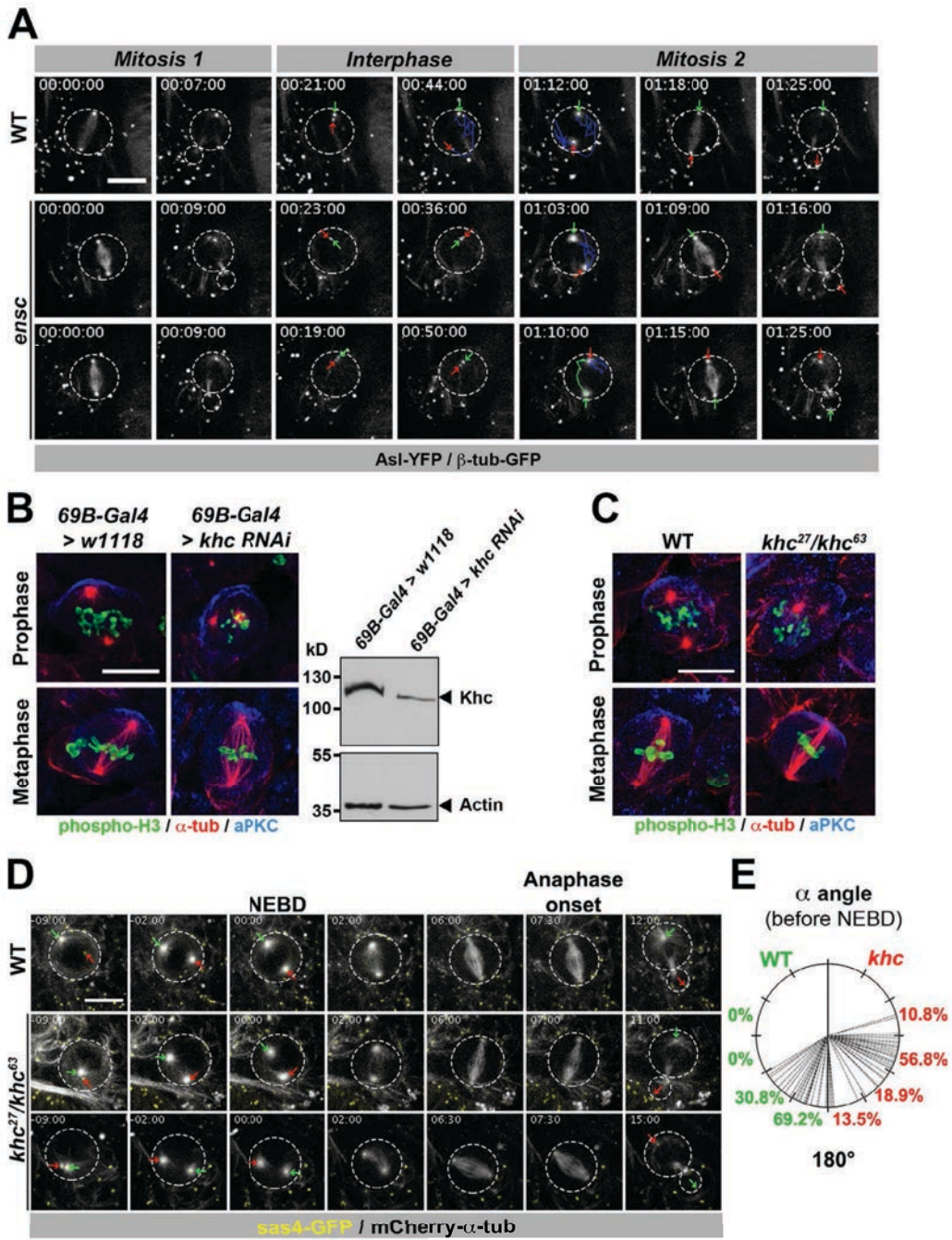


Figure 2. Centrosome separation is defective in *kinesin-1* and *encs* mutant Nbs. (A) WT (top and Video 4) and *encs* mutant (middle, bottom, and Video 5) Nbs expressing YFP-AsI (to label the centrosomes) and GFP-tubulin (to follow the daughter centrosome and Mts) were analyzed by time-lapse video microscopy. The green and blue lines follow the trajectories of the daughter and mother centrosomes, respectively. The two centrosomes did not separate fully in *encs* mutants. For this reason, in several cases (8/25, 32%), when the mother centrosome acquired its Mt nucleation potential, it was attached to the apical cortex in place of the daughter centrosome, and was therefore inherited by the Nb rather than the GMC. (B) Prophase and metaphase in control or *khc* RNAi-treated Nbs (left) and Western blot analyses of Khc (top) and actin (bottom) after *khc* or control RNAi (right). (C) Prophase and metaphase in WT and *khc*²⁷/*khc*⁶³ mutant Nbs. In B and C, tubulin is shown in red, aPKC in blue, and phospho-histone H3 Ser10 in green. (D) Duration of mitosis and centrosome positioning in WT and *khc*²⁷/*khc*⁶³ mutant Nbs expressing Sas4-GFP (yellow) and Cherry-tubulin (gray). Mitosis lasted 7.2 \pm 1.2 min in WT (*n* = 27) and 7.5 \pm 1.5 min in *khc*²⁷/*khc*⁶³ (*n* = 48) cells. *P* = 0.652. Spindle length was 10.9 \pm 0.8 μ m in WT cells and 11.3 \pm 1.8 μ m in *khc*²⁷/*khc*⁶³ mutant cells. The daughter centrosome was inherited by the GMC in 24 of the 48 *khc*²⁷/*khc*⁶³ mutant cells (50%). Time is given in hours:minutes:seconds. In A and D, the green and the red arrows indicate the daughter and mother centrosomes, respectively. The circles indicate the contours of the cells. Bars, 10 μ m. (E) Analysis of centrosome separation angle in WT (green) and *khc*²⁷/*khc*⁶³ (red) Nbs at NEBD.

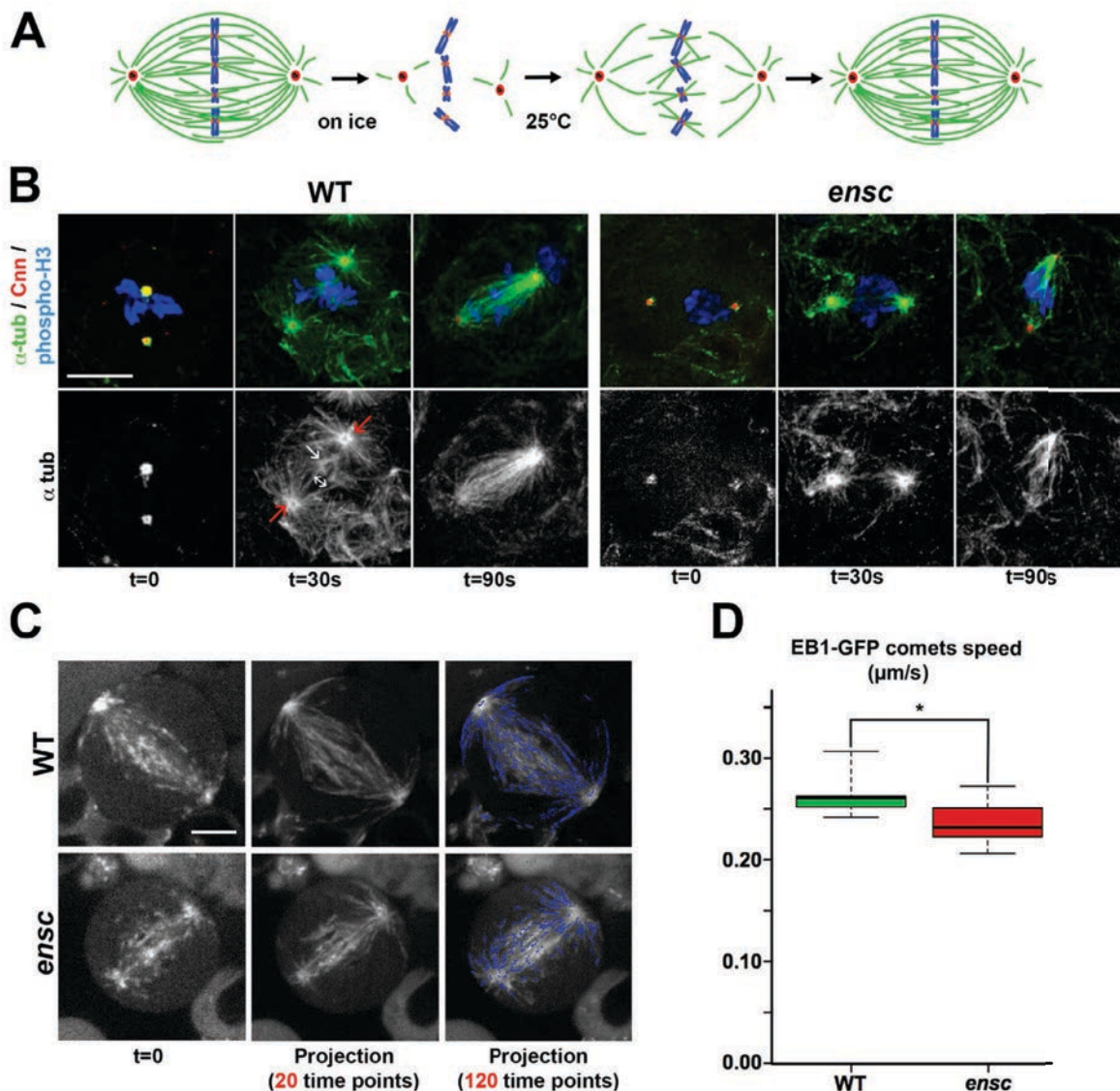


Figure 3. Ensconsin mutant Nbs display defective spindle reassembly and a lower Mt velocity in live cells. (A) Mt regrowth assay. Mts were depolymerized on ice (see Materials and methods), and spindle reformation was analyzed by immunostaining after the cells had been returned to 25°C conditions. (B) In the WT (left), Mts were depolymerized after 30 min at 0°C. Numerous Mts were nucleated by the centrosomes after 30 s at 25°C (red arrows). Small asters are visible around the chromatin (white arrow), together with Kt fibers (double-headed arrow). At 90 s, the spindles have a normal shape. In *ensc* mutant cells (right), only centrosomal Mts can be visualized after 30 s, and the spindles remain short and disorganized after 90 s. Centrosomes are shown in red (centrosomin, *cnn*), Mts (α tub) in green (gray in the lower panels), and phospho-H3 in blue. Bar, 10 μm . (C) Control (top) and *ensc* (bottom) Nbs expressing EB1-GFP were imaged by time-lapse microscopy (Video 8). A single frame (in which EB1-GFP comets are visible) is presented (left), with time projections for the 20- and 120-min time points (middle and right, respectively). Blue lines represent EB1-GFP tracks after filtering (see Materials and methods). Bar, 4 μm . (D) Quantification of Mt velocity in WT ($n = 17$) and *ensc* mutant ($n = 16$) mitotic Nbs: 0.26 and 0.23 $\mu\text{m/s}$, respectively (*, $P = 1.2 \times 10^{-4}$).

(reduced by 12%) in the *ensc* mutant than in WT Nbs (Fig. 3 D), a difference sufficient to account for the short spindles observed in *ensc* mutants.

Spindle shortening and the duration of mitosis in the Nbs of *ensc* mutants are greater in the absence of centrosomes

Given the large number of short Mts nucleated by the centrosomes in the regrowth assay, we investigated whether the spindle formation defects observed in *ensc* mutants were greater in

the absence of centrosomes. We therefore generated *ensc* and *sas-4^{s2214}* double mutant flies, the *sas-4* gene being required for centrosome duplication (Basto et al., 2006), and monitored cell division (Fig. 4). In *sas-4^{s2214}* single mutants (Video 9, left), the spindle formed without centrosomes and mitosis lasted 9.0 ± 1.2 min (Fig. 4, A and C). In *ensc, sas-4^{s2214}* double mutants (Video 9, right), mitosis lasted significantly longer (10.1 ± 1.2 min) and the distribution of Mts was more strongly affected than in the single mutant (Fig. 4, A and C). The spindles were much shorter in the double mutant ($6.7 \pm 0.6 \mu\text{m}$) than in the

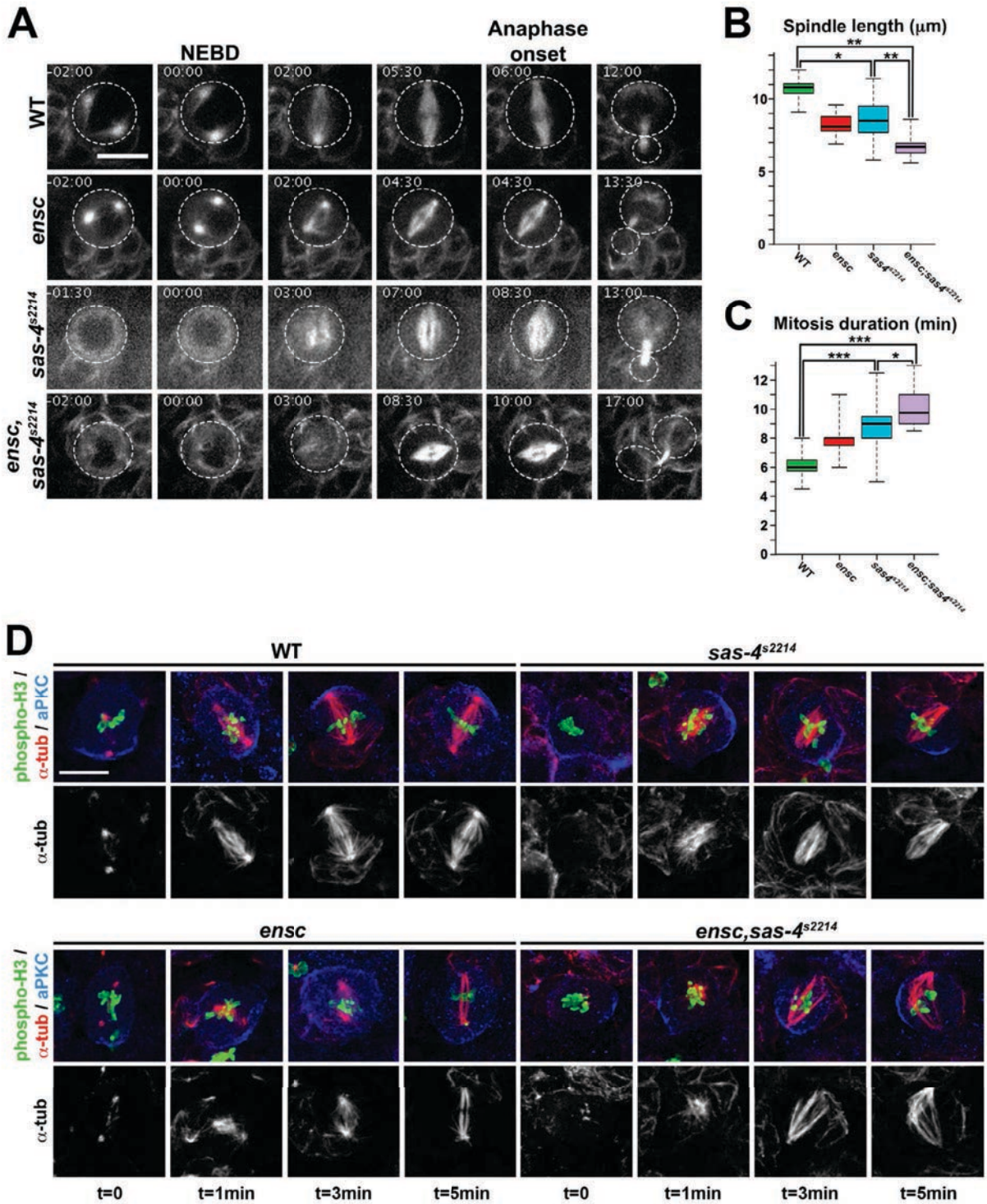


Figure 4. Enconsin-dependent spindle assembly defects are enhanced by centrosome ablation. (A) Cell division of WT, *ensc*, *sas-4^{s2214}*, and *ensc, sas-4^{s2214}* double mutant Nbs expressing β-tubulin-GFP. Time is given in minutes:seconds. The circles indicate the contours of the cells. Bar, 10 μm. (B) Analysis of mitotic spindle length in WT (green), *ensc* (red), *sas-4^{s2214}* (blue), and *ensc,sas-4^{s2214}* (purple) mutant Nbs. Spindle length was 10.7 ± 0.7 μm in the WT (*n* = 15), 8.2 ± 1.2 μm in the *ensc* mutant (*n* = 23), 8.5 ± 1.4 μm in the *sas-4^{s2214}* mutant (*n* = 45), and 6.7 ± 0.7 μm in the *ensc,sas-4^{s2214}* double mutant (*n* = 31). *, *P* = 2 × 10⁻⁶; **, *P* < 5.2 × 10⁻⁸. (C) Analysis of the duration of mitosis in WT (green), *ensc* (red), *sas-4^{s2214}* (blue), and *ensc,sas-4^{s2214}* (purple) mutant Nbs. The time between NEBD and anaphase onset was 6.1 ± 0.9 min for the controls (*n* = 23), 8.0 ± 1.2 min for the *ensc* mutant (*n* = 37), 9.0 ± 1.2 min for the *sas-4^{s2214}* mutant (*n* = 48), and 10.0 ± 1.2 min for the *ensc,sas-4^{s2214}* double mutant (*n* = 38). *, *P* = 1.8 × 10⁻³; ***, *P* < 1 × 10⁻¹⁰.

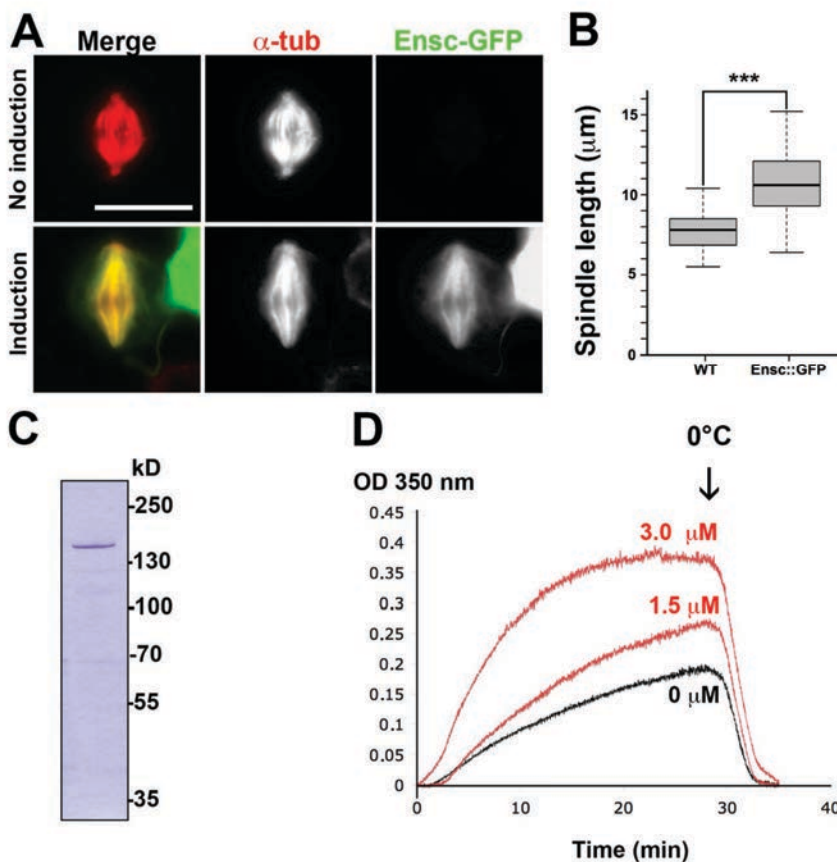


Figure 5. Enscinsin promotes Mt growth in cells and in vitro. (A) Enscinsin (Ensc) overproduction in mitotic S2 cells led to the formation of longer spindles. Enscinsin-GFP is green (gray in the panels on the right) and Mts are shown in red (gray in the middle panels). Exogenous Enscinsin-GFP is localized on the mitotic spindle during mitosis. Bar, 10 μm . (B) Analysis of mitotic spindle length in WT ($n = 56$) and Enscinsin-GFP-overexpressing mitotic S2 cells ($n = 26$). $***, P = 5.1 \times 10^{-11}$. (C) Recombinant Enscinsin purified, separated by SDS-PAGE, and stained with Coomassie blue. (D) Effect of Enscinsin on Mt polymerization in vitro. Purified porcine brain tubulin was mixed with polymerization buffer supplemented with either PBS or PBS containing Enscinsin on ice. Mt polymerization was induced by heating at 35°C . Absorbance at 350 nm was monitored to evaluate the formation of Mt polymers. After 28 min, the samples were shifted to 0°C to estimate protein aggregation. Enscinsin increased the rate of Mt polymerization and the total number of polymers in a dose-dependent manner (red curves), as shown by comparison with buffer alone (black curve).

sas-4^{s2214} ($8.5 \pm 1.4 \mu\text{m}$) and *ensc* single mutants ($8.0 \pm 0.6 \mu\text{m}$; Fig. 4 B). In parallel, we repeated the Mt regrowth assay (Fig. 4 D). 1 min after the return to 25°C , long Mts were seen in the WT and the *sas-4^{s2214}* single mutant, but not in the *ensc* single mutant and the *ensc,sas-4^{s2214}* double mutant. Bipolar spindle assembly occurred within 3 min in flies lacking either *sas-4^{s2214}* or *enscinsin*, but was severely compromised in the double mutant. These results suggest that the centrosome favors spindle assembly when Mt polymerization rates are low in mitotic *ensc* mutant cells.

Enscinsin is a mitotic spindle-associated protein that stimulates Mt growth in S2 cells and in vitro

We analyzed the distribution of Enscinsin by staining dividing *Drosophila* embryos with purified antibodies. Enscinsin colocalized with the mitotic apparatus during early development (Fig. S3 B). Furthermore, studies of a functional *Drosophila* line ubiquitously expressing the GFP-tagged Enscinsin confirmed the colocalization of Enscinsin-GFP with the Mt network

and the mitotic spindle during Nb cell division and in early embryos (Fig. S3, C and D; and Video 10).

Consistent with the Enscinsin-dependent stimulation of Mt growth during M phase, S2 cells with higher Enscinsin levels formed longer spindles ($10.9 \pm 2.1 \mu\text{m}$, $n = 26$) than control cells ($7.8 \pm 1.0 \mu\text{m}$, $n = 56$; Fig. 5, A and B). In a complementary experiment, we assessed the impact of Enscinsin activity on Mt polymerization in vitro, using purified porcine brain tubulin and recombinant Enscinsin (Fig. 5 C) in a turbidity assay, to determine whether this protein could modify the Mt polymerization rate in vitro (Weis et al., 2010; Gaskin, 2011). Enscinsin stimulated Mt polymerization in a dose-dependent manner (Fig. 5 D). This function is entirely consistent with a lower Mt velocity in the deletion mutant and with a longer spindle length in conditions of Enscinsin overexpression.

In conclusion, our study reveals a dual role for Enscinsin. First, during interphase, this protein promotes centrosome separation and positioning through cooperation with its binding partner, Kinesin-1. Second, it stimulates Mt growth during mitosis, independent of Kinesin-1.

(D) Mt regrowth assay in WT, *ensc*, *sas-4^{s2214}*, and *ensc,sas-4^{s2214}* mutant Nbs. 1 and 3 min after the return to 25°C , numerous long Mts were detected in *sas-4^{s2214}* Nbs. In the *ensc,sas-4^{s2214}* double mutant, short Mts were found closely apposed to the mitotic chromatin mass. At 5 min, the spindles resembled Mt bundles rather than the bipolar structure seen in *sas-4^{s2214}* mutants. aPKC is shown in blue, Mts (α -tub) are shown in red (and gray), and phospho-H3 is shown in green. Bar, 10 μm .

Human Enscosin/MAP7/EMAP115 was first discovered two decades ago, and was described as a MAP that “ensconces” on Mts (Bulinski and Bossler, 1994). The data presented here reveal previously unidentified roles for this known MAP in the regulation of mitotic and interphase Mt-based processes. Further studies are required to determine how a single MAP can contribute to such different activities during the cell cycle.

Materials and methods

Mt co-sedimentation assay

Canton-S fly populations were amplified, maintained, and fed in population cages with fresh yeast on agar plates twice daily for 5 d. We collected 0–2-h-synchronized embryos, a time period corresponding to syncytial division. In parallel, flies were allowed to lay eggs for 15 h and the collected embryos were left for an additional 2 h to allow the last embryos laid to reach the blastula stage. This protocol discriminates between the dividing/mitotic and differentiating/interphase stages. We disrupted 1 g of mitotic and interphase embryos by passage through a French press in a total volume of 2 ml of lysis buffer (LB: 20 mM Hepes, pH 7.4, 150 mM KCl, 1 mM MgCl₂, 1 mM EDTA, and 0.5% NP-40) supplemented with protease inhibitor and phosphatase inhibitor cocktails, prepared according to the manufacturer's instructions (Roche). The crude extracts were filtered and centrifuged for 15 min at 15,000 g. The resulting supernatant (~1.2 ml) was centrifuged at 100,000 g for 25 min at 4°C to remove insoluble materials. These mitotic and interphase supernatants, obtained by high-speed centrifugation, were supplemented with 1 mM GTP and 20 μM taxol, and incubated for 20 min at 25°C. The polymerized Mts and MAPs were then recovered by centrifugation for 20 min at 100,000 g and 25°C on a glycerol cushion (BRB80: 80 mM Pipes, 1 mM EGTA supplemented with 40% glycerol, 1 mM GTP, and 20 μM taxol). The Mt pellets were washed gently twice with BRB80 and suspended in Laemmli sample buffer supplemented with 5% β-mercaptoethanol.

Liquid chromatography/tandem mass spectrometry (LC-MS/MS)

MAPs were resolved by SDS-PAGE in 4–12% XT Bis-Tris polyacrylamide gradient gels (Bio-Rad Laboratories). The gel was stained with SYPRO Ruby gel stain according to the manufacturer's instructions (Bio-Rad Laboratories). A Gelliance charge-coupled device (CCD)-based imaging system (PerkinElmer) was used for image acquisition.

The lanes on the SDS-PAGE gel corresponding to mitotic and interphase/differentiating embryo extracts were cut into 20 gel slices per lane with a disposable lane picker (Gel Company). Gel slices were deposited in 96-well plates. A liquid handling station (MassPrep; Waters) was used, with sequencing-grade modified trypsin (Promega) according to the manufacturer's instructions, for in-gel protein digestion. Peptide extracts were then dried by evaporation in a SpeedVac (Thermo Fisher Scientific).

LC-MS/MS experiments were performed with an LTQ linear ion trap mass spectrometer connected to a Thermo Surveyor MS pump and equipped with a nano-electrospray ion source (all from Thermo Fisher Scientific). The peptides were separated in a 10-cm-long PicoFrit BioBasic C18 column with an internal diameter of 0.075 mm (New Objective), with a linear gradient extending from 2 to 50% solvent B (acetonitrile, 0.1% formic acid) over a period of 30 min, at a flow rate of 200 nl/min. Mass spectra were acquired in the data-dependent acquisition mode (Xcalibur software, version 2.0). Each full-scan mass spectrum (m/z 400–2000) was followed by the collision-induced dissociation of the seven ions giving the most intense signals. The dynamic exclusion function was enabled (30 s of exclusion), and the relative collisional fragmentation energy was set at 35%.

All MS/MS spectra were analyzed with Mascot (version 2.4.0; Matrix Science), set up to search against a *Drosophila* UniRef100 protein database (33,950 entries as of November 2012), assuming digestion with trypsin. The fragment and parent ion mass tolerances were 0.5 D and 2.0 D, respectively. The carbamidomethylation of cysteine was specified as a fixed modification, and the oxidation of methionine and phosphorylation on serine, threonine, and tyrosine were specified as variable modifications. Two missed cleavages were allowed.

Scaffold (version 3.6.2; Proteome Software, Inc.) was used to sum spectral counts, to validate MS/MS-based peptide and protein identifications, and to group peptides into proteins. Peptide identifications were accepted if they could be established with a probability >95%, as specified by the Peptide Prophet algorithm (Nesvizhskii et al., 2003), and

contained at least two identified peptides. Protein probabilities were assigned by the Protein Prophet algorithm (Keller et al., 2002). Proteins that contained similar peptides and could not be differentiated on the basis of MS/MS analysis alone were grouped to satisfy the principles of parsimony. Semiquantitative spectral count analysis results obtained with Scaffold provide an estimate of relative protein abundance between conditions. Enrichment ratios were calculated from spectral count information for interphase extracts.

Functional enrichment analysis and network analysis

We used Cytoscape 2.8.3 and BiNGO version 2.44 to identify biological processes overrepresented among the proteins classified into mitotic, general, or interphasic MAPs (Shannon et al., 2003; Maere et al., 2005). We used BiNGO with the GO Slim Generic Gene Ontology Annotation. The significance threshold was set at P = 0.05 (hypergeometric test, Benjamini and Hochberg family-wise error rate correction).

Plasmid constructs

All constructs were based on isoform B of Enscosin, which has been shown to rescue *ensc* mutants (Sung et al., 2008). All cloning procedures were performed with the Gateway system (Life Technologies) and the clones were checked by sequencing. Full-length Enscosin, the N-terminal Mt-binding domain/Enscosin homology region 1 domain (MBD/EHR1), and the conserved C-terminal EHR2 domain were amplified by PCR and inserted into the pENTR/TOPO vector (Life Technologies) to create the entry clones from PCR products: full-length Enscosin (Ensc-FL), without a STOP codon, with the primers 5'-CACCAATATGGCGAGTCTTGGGGGCCAACAC-3' and 5'-CAGCAGC-GATATATCTTTATTTTCGTGAC-3'; an N-terminal fragment containing the EHR1 domain (Ensc-EHR1), with the primers 5'-CACCAATATGGCGAGTCTTGGGGGCCAACAC-3' and 5'-CGGAGGTTCCCGCTTCAAGGCGCTC-3'; and a C-terminal fragment containing the EHR2 fragment (Ensc-EHR2), with the primers 5'-CACCATGCAGGCTGCGCCCAAGAAACCATCGC-3' and 5'-CAGCAGCGATATATCTTTATTTTCGTGAC-3'.

Ensc-FL, Ensc-EHR1, and Ensc-EHR2 were also inserted into pET102/TOPO (Life Technologies) to generate hexahistidine (6X-HIS)-tagged constructs. Ensc-EHR1 and Ensc-EHR2 were also recombined in pMT-DEST48. Ensc-FL-GFP was amplified by PCR with the primers 5'-GCAATGGCGA-GTCTTGGGG-3' and 5'-AATCTGTACAGCTCGTCCATGC-3' and inserted directly into pMT/V5-His-TOPO.

Isoform E of EB1 was amplified by PCR with the oligonucleotides 5'-CACCAACATGGCTGTAACGCTACTCC-3' and 5'-ATACTCTCGTC-CTCTGGTGG-3' and inserted into pENTR/TOPO.

The open reading frames encoding EB1 and Enscosin were introduced into pUWG with Gateway technology (Invitrogen) to produce the constructs pUWG-EB1 and pUWG-Ensc used for fly transformation, allowing the ubiquitous expression of GFP-tagged proteins.

Fly strains

Flies were maintained under standard conditions at 25°C. Transgenic flies with the following genotypes were used for RNAi: TubGAL80^{UAS};69B-GAL4 and 69B-GAL4. Transgenic flies carrying UAS and hairpin sequences were obtained from the Vienna *Drosophila* RNAi Center (Dietzl et al., 2007). Flies expressing the full-length EB1-GFP and full-length Enscosin-GFP constructs were used for time-lapse imaging. They were obtained from BestGene Inc. after P-element-mediated transformation with the pUWG-EB1 and pUWG-Ensc vectors. The Enscosin-GFP transgene conferred early rescue of the viability of *ensc* mutants. Asterless-YFP (Asl)-expressing flies (Rebollo et al., 2007) were provided by C. Gonzalez (Institute for Research in Biomedicine, Barcelona, Spain). *Khc* mutant flies carrying amino-acid substitutions have been described elsewhere (Djagaeva et al., 2012) and were provided by A. Guichet (Institut Jacques Monod, Paris, France), B. Saxton (University of California, Santa Cruz, Santa Cruz, CA), and A. Ephrussi (European Molecular Biology Laboratory, Heidelberg, Germany). A combination of *Khc*²⁷ (null allele) and *Khc*⁶³ (hypomorphic allele) was used in this study. The strains expressing mCherry-α-tubulin and GFP-Sas-4 were provided by R. Basto (Institut Curie, Paris, France) and M. Bettencourt-Dias (Instituto Gulbenkian de Ciencia, Oeiras, Portugal), respectively. The *enscosin* mutant fly stocks *enscΔC* (C-terminal deletion), *enscΔN* (N-terminal deletion), and *enscΔnull* (full gene deletion, referred to as *ensc*) were described in the Results and discussion section, obtained by P-element excision, and were provided by P. Rorth (Institute of Molecular and Cell Biology, Singapore; Sung et al., 2008). β-tubulin-GFP flies (Inoue et al., 2004) were provided by M. Savoian and D. Glover (University of Cambridge, Cambridge, England, UK). Jupiter-GFP and the *sas-4*²²¹⁴ mutant (Basto et al., 2006) were obtained from the Bloomington *Drosophila*

Stock Center. With the exception of Jupiter-GFP, which is a trap line with expression under the control of its own promoter (Morin et al., 2001), all GFP and CherryFP fusion proteins were ubiquitously produced under the control of the polyubiquitin promoter.

RNAi in the brain

TUB-GAL80^{ts}; 69B-GAL4 females were crossed with transgenic males carrying UAS-RNAi constructs for the candidate genes. After 6 d at 20°C, the adults were removed and the vials were shifted to 29°C to induce RNAi for 3 d. Brains from five wandering third-instar larvae were then dissected and fixed for immunostaining. In parallel, at least five brains were squashed and stained with 1 µg/ml DAPI for the visualization of chromosome abnormalities (Donaldson et al., 2001).

Production of recombinant proteins and antibody

The vectors pET102-*Ensc*-FL, pET102-*Ensc*-EHR1, and pET102-*Ensc*-EHR2 were transformed in *Escherichia coli* BL21 (DE3). The production of the *Ensc*-FL, *Ensc*-EHR1, and *Ensc*-EHR2 fragments was induced by incubation with 1 mM IPTG for 4 h at 25°C. 6x-HIS-tagged proteins were purified on Ni-NTA resin (QIAGEN) and dialyzed overnight against PBS at 4°C. The purified *Ensc* EHR1 and EHR2 domains present in all *Ensc* isoforms were generally used for the immunization of rabbits for polyclonal antibody production (Eurogentec). For in vitro Mt polymerization assays, *Ensc*-FL was concentrated on Amicon concentrators (molecular weight cut-off 50 kD) to a final concentration of 30 µM in PBS (EMD Millipore).

Immunofluorescence analysis

S2 cells were plated on concanavalin A-coated coverslips and incubated for 1 h, then fixed by incubation in methanol for 10 min at -20°C. The fixed cells were processed for IF analyses as described previously (Romé et al., 2010). Slides were mounted in ProLong Gold antifading mounting medium (Life Technologies) and observed under an upright DMRXA fluorescence microscope (Leica) equipped with a 63x 1.3 NA objective lens. Images were acquired with a CCD camera (CoolSNAP HQ; Photometrics) and processed with MetaMorph software (Universal Imaging).

For the analysis of spindle morphology in brain Nbs, we found that the following protocol fully preserved the Mt cytoskeleton during mitosis more effectively than the use of the standard PBS-derived fixative. For whole-mount CNS immunostaining, third-instar larval brains were dissected in testis buffer (TB: 183 mM KCl, 47 mM NaCl, 10 mM Tris, and 1 mM EDTA, pH 6.8; Bonaccorsi et al., 2011) and fixed by incubation in TB (TB supplemented with 10% formaldehyde and 0.01% Triton X-100) for 20 min at 25°C.

Fixed brains were rapidly washed once in PBS and twice in 0.1% Triton X-100 in PBS (PBST) for 10 min each time. The fixed tissue was incubated overnight at 4°C with primary antibodies in PBST supplemented with 1% BSA (PBSTB). The samples were washed twice, for 15 min each time, in PBST, and were then incubated for 1 h at room temperature with secondary antibodies in PBSTB. They were washed twice, for 15 min each time, in PBST, then mounted on slides in ProLong Gold and observed with a SP5 confocal microscope (Leica) equipped with a 63x objective lens (NA 1.40). Images were acquired and processed with ImageJ software.

For the Mt regrowth assay in Nbs, we followed a method previously used to study *misato*, with several modifications (Mottier-Pavie et al., 2011). Brains were dissected in Schneider's medium supplemented with 10% FCS and incubated on ice for 30 min to allow complete Mt depolymerization in a total volume of 50 µl of Schneider's medium. Depending on the genotype analyzed, Mt regrowth was induced at various time points by incubating the samples in a water bath at 25°C. Fixation is triggered by adding 500 µl of TBF and incubating for 20 min at 25°C. Brains were then processed for immunostaining. The experiment was performed at least three times and at least 20 spindles were analyzed for each experiment.

Antibodies and Western blotting

The monoclonal YL1/2 rat anti-detyrosinated tubulin antibody (1:200) and the mouse monoclonal and rabbit polyclonal antiphosphorylated histone H3 (Ser10) antibodies (1:500) were obtained from EMD Millipore. The anti-GFP mouse monoclonal antibody (1:1,000) was obtained from Roche, the rabbit anti-PKCζ (C-20; 1:200) and rabbit anti-actin (1:4,000) polyclonal antibodies were obtained from Santa Cruz Biotechnology, Inc., the mouse monoclonal anti-V5 antibody was obtained from Life Technologies (1:3,000), and the rabbit polyclonal anti-Khc antibody (1:2,000) was obtained from Cytoskeleton, Inc. The rabbit polyclonal anti-centrosomin antibody (1:1,000) was provided by T. Megraw (Florida State University, Tallahassee, FL; Megraw et al., 2001). The affinity-purified

rabbit anti-Mad2 polyclonal antibody (1:500) was provided by D. Sharp (Albert Einstein College of Medicine, Bronx, NY). The rabbit polyclonal anti-*Ensc* antibody was affinity purified from antigens (EH1 and EH2) immobilized on nitrocellulose membrane and used at a concentration of 1 µg/ml according to a protocol described previously (Montebault et al., 2007). Goat secondary peroxidase-conjugated antibodies (1:5,000) were obtained from Jackson ImmunoResearch Laboratories, and donkey Alexa Fluor-conjugated secondary antibodies (1:1,000) were obtained from Life Technologies. For Western blotting, ECL reagent was purchased from Thermo Fisher Scientific.

Live microscopy

Brains expressing the various labeled proteins were dissected in Schneider's *Drosophila* medium containing 10% FCS. Isolated brains were loaded and mounted on stainless steel slides with fat bodies dissected from WT larvae (Siller et al., 2005). The preparations were sealed with mineral oil (Sigma-Aldrich). Images were acquired with a spinning-disk system mounted on an inverted microscope (Eclipse Ti; Nikon) equipped with a 60x 1.4 NA objective lens at 25°C. Z series were acquired every 30 or 60 s with a CCD camera (CoolSNAP HQ²; Photometrics) and a digital camera (sCMOS ORCA Flash 4.0; Hamamatsu Photonics) controlled by MetaMorph acquisition software version X. Images were processed with ImageJ software and are presented as maximum-intensity projections. The mother and daughter centrosomes can be unambiguously distinguished on the basis of their different Mt nucleation potentials after separation, after cytokinesis, or immediately before mitosis (Rebollo et al., 2007).

For Mt end tracking in Nbs, WT and *ensc* mutant brains expressing EB1-GFP were gently squashed in 13.4 µl of fresh Schneider's media (Invitrogen), between a slide and a 22 x 22-mm coverslip, and the excess medium was absorbed with filter paper. The preparation was sealed with mineral halocarbon oil 700 (Sigma-Aldrich) to immobilize it and to prevent cell movement during imaging. Mitotic Nbs were imaged every 0.5 s for 1 min at 25°C, with a 100x 1.4 NA objective lens.

At least 16 mitotic prometaphase Nbs were imaged for comet tracking. The Mt ends were tracked with the single-particle tracking routine available in Icy image analysis software (Olivo-Marin, 2002; Chenouard et al., 2013). The routine parameters were adjusted for the detection and tracking of most of the Mt ends. Nevertheless, because of the high density of Mts, we observed frequent erroneous merging of tracks corresponding to different Mt ends. These errors were filtered out with a customized Matlab (MathWorks) routine. The crude tracks were first broken at track steps characterized by an instantaneous speed of >0.78 µm/s, probably corresponding to erroneous jumps between different Mt tracks. They were also broken at positions at which a change in track direction of >60° was observed. We retained only the remaining filtered tracks corresponding to at least three time points and we estimated the growing speed for each track by averaging the instantaneous speeds along the track.

Cell culture and transfection

S2 cells were transiently transfected as described previously, and protein production was induced by incubation with 0.3 mM CuSO₄ for 24 h (Romé et al., 2010).

Mt self-assembly and turbidity assays

A 40-µM solution of tubulin purified from porcine brain was prepared in 1 mM GTP in BRB80, and centrifuged for 10 min at 30,000 g, at 4°C, before assembly (Weis et al., 2010). Tubulin polymerization was induced by incubating the samples at 35°C and was monitored turbidimetrically, at 350 nm, with a UVIKON XS spectrophotometer (BioTek Instruments). We evaluated *Ensc* activity by adding various concentrations of the recombinant protein to tubulin (1.5 and 3 µM). For each experiment, the temperature was shifted to 4°C after 28 min of recording to estimate the degree of protein aggregation after assembly (Weis et al., 2010). Spectrophotometric curves were corrected so as to reflect only Mt polymerization.

Statistical analysis

Differences between datasets were assessed in a nonparametric test (Mann-Whitney-Wilcoxon), with values of P < 0.001 considered significant.

Online supplemental material

Fig. S1 shows the screening strategy used in this study. Fig. S2 demonstrates that the SAC is required for viability and to prevent chromosome segregation defects after *Ensc* RNAi. Fig. S3 shows the specificity of the *Ensc* antibody and *Ensc* localization. Table S1 summarizes the phenotypes obtained after RNAi for 18 putative mitotic regulators. Table S2

shows the proteins associated with mitotic and interphase Mt pellets, respectively, and their relative abundance. Table S3 shows the proteins screened in this study. Video 1 shows WT dividing Nbs. Video 2 shows dividing *ensc* mutant Nbs with short spindles. Video 3 shows *ensc* dividing Nbs with centrosome positioning and separation defects. Video 4 shows a WT Nb, expressing labeled centrosomes and Mts, between two consecutive mitoses. Video 5 shows the centrosome separation defects in an *ensc* mutant during interphase and the defective daughter centrosome inheritance. Video 6 shows the centrosomes and the Mts in a WT Nb. Video 7 demonstrates the defective centrosome separation, positioning, and inheritance defect but normal spindle assembly in *khc* mutants. Video 8 shows the Mt dynamics in WT and *ensc* mitotic Nbs. Video 9 shows the short spindle formation in the absence of centrosomes and in the absence of both centrosome and Enscn. Video 10 reveals the Enscn-GFP fusion protein association with Mts in a dividing Nb and surrounding cells. Supplemental file 1, entitled "traifilt," corresponds to the source code of the routine used to filter the trajectories of the Mt ends obtained from the single particle tracking routine available on the lcy image analysis software. Supplemental file 2, entitled "traifilt_batch," corresponds to the source code of the routine which allows batching the filtering of the Mt end trajectories. Online supplemental material is available at <http://www.jcb.org/cgi/content/full/jcb.201311094/DC1>.

We would like to thank D. Glover, M. Savoian, C. Gonzalez, T. Megraw, D. Sharp, D. Buster, A. Guichet, W. Saxton, R. Bcsto, A. Ephrussi, M. Bettencourt-Dias, and P. Rorth for fly stocks and antibodies. We thank M. Savoian, C. Benaud, and S. Giet for critical reading of the manuscript. We thank Drs. A. Royou and E. Montembault for helpful discussions.

This work was funded by the Ligue Nationale Contre le Cancer, l'Association de la Recherche contre le Cancer, Biosit, and the University of Rennes 1. This work was supported by the Canadian Institutes of Health Research (grant No. MC-178013 to GGP). The authors wish to thank the Proteomics Platform of Quebec Genomic Center for analytical services and the Microscopy Rennes Imaging Center. G.G. Poirier holds a Canada Research Chair in Proteomics. E. Gallaud and R. Caous are doctoral fellows of the Région Bretagne and the French Ministry of Research, respectively.

The authors declare no competing financial interests.

Submitted: 21 November 2013

Accepted: 12 February 2014

References

- Barlan, K., W. Lu, and V.I. Gelfand. 2013. The microtubule-binding protein enscn is an essential cofactor of kinesin-1. *Curr. Biol.* 23:317–322. <http://dx.doi.org/10.1016/j.cub.2013.01.008>
- Basto, R., J. Lau, T. Vinogradova, A. Gardiol, C.G. Woods, A. Khodjakov, and J.W. Raff. 2006. Flies without centrioles. *Cell*. 125:1375–1386. <http://dx.doi.org/10.1016/j.cell.2006.05.025>
- Bonaccorsi, S., M.G. Giansanti, G. Cenci, and M. Gatti. 2011. Preparation of meiotic chromosomes from larval and pupal *Drosophila* testes. *Cold Spring Harb Protoc.* 2011:t579.
- Bulinski, J.C., and A. Bossler. 1994. Purification and characterization of enscn, a novel microtubule stabilizing protein. *J. Cell Sci.* 107:2839–2849.
- Cassimeris, L., and J. Morabito. 2004. TOGp, the human homolog of XMAP215/Dis1, is required for centrosome integrity, spindle pole organization, and bipolar spindle assembly. *Mol. Biol. Cell.* 15:1580–1590. <http://dx.doi.org/10.1091/mbc.E03-07-0544>
- Caussinus, E., and C. Gonzalez. 2005. Induction of tumor growth by altered stem-cell asymmetric division in *Drosophila melanogaster*. *Nat. Genet.* 37:1125–1129. <http://dx.doi.org/10.1038/ng1632>
- Chenouard, N., I. Bloch, and J.C. Olivo-Marin. 2013. Multiple hypothesis tracking for cluttered biological image sequences. *IEEE Trans. Pattern Anal. Mach. Intell.* 35:2736–2750. <http://dx.doi.org/10.1109/TPAMI.2013.97>
- Conduit, P.T., and J.W. Raff. 2010. Cnn dynamics drive centrosome size asymmetry to ensure daughter centriole retention in *Drosophila* neuroblasts. *Curr. Biol.* 20:2187–2192. <http://dx.doi.org/10.1016/j.cub.2010.11.055>
- Cullen, C.F., P. Deák, D.M. Glover, and H. Ohkura. 1999. mini spindles: A gene encoding a conserved microtubule-associated protein required for the integrity of the mitotic spindle in *Drosophila*. *J. Cell Biol.* 146:1005–1018. <http://dx.doi.org/10.1083/jcb.146.5.1005>
- Dietzl, G., D. Chen, F. Schnorrrer, K.C. Su, Y. Barinova, M. Fellner, B. Gasser, K. Kinsey, S. Oppel, S. Scheiblaue, et al. 2007. A genome-wide transgenic RNAi library for conditional gene inactivation in *Drosophila*. *Nature*. 448:151–156. <http://dx.doi.org/10.1038/nature05954>
- Djagaeva, I., D.J. Rose, A. Lim, C.E. Venter, K.M. Brenda, P. Moua, and W.M. Saxton. 2012. Three routes to suppression of the neurodegenerative phenotypes caused by kinesin heavy chain mutations. *Genetics*. 192:173–183. <http://dx.doi.org/10.1534/genetics.112.140798>
- Donaldson, M.M., A.A. Tavares, H. Ohkura, P. Deak, and D.M. Glover. 2001. Metaphase arrest with centromere separation in polo mutants of *Drosophila*. *J. Cell Biol.* 153:663–676. <http://dx.doi.org/10.1083/jcb.153.4.663>
- Gadde, S., and R. Heald. 2004. Mechanisms and molecules of the mitotic spindle. *Curr. Biol.* 14:R797–R805. <http://dx.doi.org/10.1016/j.cub.2004.09.021>
- Gaetz, J., and T.M. Kapoor. 2004. Dynein/dynactin regulate metaphase spindle length by targeting depolymerizing activities to spindle poles. *J. Cell Biol.* 166:465–471. <http://dx.doi.org/10.1083/jcb.200404015>
- Gaskin, F. 2011. Analysis of microtubule assembly kinetics using turbidimetry. *Methods Mol. Biol.* 777:99–105. http://dx.doi.org/10.1007/978-1-61779-252-6_7
- Goodwin, S.S., and R.D. Vale. 2010. Patronin regulates the microtubule network by protecting microtubule minus ends. *Cell*. 143:263–274. <http://dx.doi.org/10.1016/j.cell.2010.09.022>
- Goshima, G., R. Wollman, N. Stuurman, J.M. Scholey, and R.D. Vale. 2005. Length control of the metaphase spindle. *Curr. Biol.* 15:1979–1988. <http://dx.doi.org/10.1016/j.cub.2005.09.054>
- Inoue, Y.H., M.S. Savoian, T. Suzuki, E. Máthé, M.T. Yamamoto, and D.M. Glover. 2004. Mutations in orbit/mast reveal that the central spindle is comprised of two microtubule populations, those that initiate cleavage and those that propagate furrow ingression. *J. Cell Biol.* 166:49–60. <http://dx.doi.org/10.1083/jcb.200402052>
- Januschke, J., and C. Gonzalez. 2010. The interphase microtubule aster is a determinant of asymmetric division orientation in *Drosophila* neuroblasts. *J. Cell Biol.* 188:693–706. <http://dx.doi.org/10.1083/jcb.200905024>
- Januschke, J., S. Llamazares, J. Reina, and C. Gonzalez. 2011. *Drosophila* neuroblasts retain the daughter centrosome. *Nat Commun.* 2:243. <http://dx.doi.org/10.1038/ncomms1245>
- Keller, A., A.I. Nesvizhskii, E. Kolker, and R. Aebersold. 2002. Empirical statistical model to estimate the accuracy of peptide identifications made by MS/MS and database search. *Anal. Chem.* 74:5383–5392. <http://dx.doi.org/10.1021/ac025747h>
- Laycock, J.E., M.S. Savoian, and D.M. Glover. 2006. Antagonistic activities of Klp10A and Orbit regulate spindle length, bipolarity and function in vivo. *J. Cell Sci.* 119:2354–2361. <http://dx.doi.org/10.1242/jcs.02957>
- Maere, S., K. Heymans, and M. Kuiper. 2005. BiNGO: A Cytoscape plugin to assess overrepresentation of gene ontology categories in biological networks. *Bioinformatics*. 21:3448–3449. <http://dx.doi.org/10.1093/bioinformatics/bti551>
- Maiato, H., C.L. Rieder, and A. Khodjakov. 2004. Kinetochore-driven formation of kinetochore fibers contributes to spindle assembly during animal mitosis. *J. Cell Biol.* 167:831–840. <http://dx.doi.org/10.1083/jcb.200407090>
- Maiato, H., A. Khodjakov, and C.L. Rieder. 2005. *Drosophila* CLASP is required for the incorporation of microtubule subunits into fluxing kinetochore fibres. *Nat. Cell Biol.* 7:42–47. <http://dx.doi.org/10.1038/ncb1207>
- Megraw, T.L., L.R. Kao, and T.C. Kaufman. 2001. Zygotic development without functional mitotic centrosomes. *Curr. Biol.* 11:116–120. [http://dx.doi.org/10.1016/S0960-9822\(01\)00017-3](http://dx.doi.org/10.1016/S0960-9822(01)00017-3)
- Metzger, T., V. Gache, M. Xu, B. Cadot, E.S. Folker, B.E. Richardson, E.R. Gomes, and M.K. Baylies. 2012. MAP and kinesin-dependent nuclear positioning is required for skeletal muscle function. *Nature*. 484:120–124. <http://dx.doi.org/10.1038/nature10914>
- Montembault, E., S. Dutertre, C. Prigent, and R. Giet. 2007. PRP4 is a spindle assembly checkpoint protein required for MPS1, MAD1, and MAD2 localization to the kinetochores. *J. Cell Biol.* 179:601–609. <http://dx.doi.org/10.1083/jcb.200703133>
- Morin, X., R. Daneman, M. Zavortink, and W. Chia. 2001. A protein trap strategy to detect GFP-tagged proteins expressed from their endogenous loci in *Drosophila*. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*. 98:15050–15055. <http://dx.doi.org/10.1073/pnas.261408198>
- Mottier-Pavie, V., G. Cenci, F. Verni, M. Gatti, and S. Bonaccorsi. 2011. Phenotypic analysis of misato function reveals roles of noncentrosomal microtubules in *Drosophila* spindle formation. *J. Cell Sci.* 124:706–717. <http://dx.doi.org/10.1242/jcs.072348>
- Mummery-Widmer, J.L., M. Yamazaki, T. Stoeger, M. Novatchkova, S. Bhalerao, D. Chen, G. Dietzl, B.J. Dickson, and J.A. Knoblich. 2009. Genome-wide analysis of Notch signalling in *Drosophila* by transgenic RNAi. *Nature*. 458:987–992. <http://dx.doi.org/10.1038/nature07936>
- Nesvizhskii, A.I., A. Keller, E. Kolker, and R. Aebersold. 2003. A statistical model for identifying proteins by tandem mass spectrometry. *Anal. Chem.* 75:4646–4658. <http://dx.doi.org/10.1021/ac0341261>

- Neumüller, R.A., and J.A. Knoblich. 2009. Dividing cellular asymmetry: asymmetric cell division and its implications for stem cells and cancer. *Genes Dev.* 23:2675–2699. <http://dx.doi.org/10.1101/gad.1850809>
- Neumüller, R.A., C. Richter, A. Fischer, M. Novatchkova, K.G. Neumüller, and J.A. Knoblich. 2011. Genome-wide analysis of self-renewal in *Drosophila* neural stem cells by transgenic RNAi. *Cell Stem Cell.* 8:580–593. <http://dx.doi.org/10.1016/j.stem.2011.02.022>
- Olivo-Marin, J.C. 2002. Extraction of spots in biological images using multi-scale products. *Pattern Recognit.* 35:1989–1996. [http://dx.doi.org/10.1016/S0031-3203\(01\)00127-3](http://dx.doi.org/10.1016/S0031-3203(01)00127-3)
- Rebollo, E., P. Sampaio, J. Januschke, S. Llamazares, H. Varmark, and C. González. 2007. Functionally unequal centrosomes drive spindle orientation in asymmetrically dividing *Drosophila* neural stem cells. *Dev. Cell.* 12:467–474. <http://dx.doi.org/10.1016/j.devcel.2007.01.021>
- Romé, P., E. Montembault, N. Franck, A. Pascal, D.M. Glover, and R. Giet. 2010. Aurora A contributes to p150(glued) phosphorylation and function during mitosis. *J. Cell Biol.* 189:651–659. <http://dx.doi.org/10.1083/jcb.201001144>
- Rusan, N.M., and M. Peifer. 2007. A role for a novel centrosome cycle in asymmetric cell division. *J. Cell Biol.* 177:13–20. <http://dx.doi.org/10.1083/jcb.200612140>
- Sawin, K.E., K. LeGuellec, M. Philippe, and T.J. Mitchison. 1992. Mitotic spindle organization by a plus-end-directed microtubule motor. *Nature.* 359:540–543. <http://dx.doi.org/10.1038/359540a0>
- Shannon, P., A. Markiel, O. Ozier, N.S. Baliga, J.T. Wang, D. Ramage, N. Amin, B. Schwikowski, and T. Ideker. 2003. Cytoscape: a software environment for integrated models of biomolecular interaction networks. *Genome Res.* 13:2498–2504. <http://dx.doi.org/10.1101/gr.1239303>
- Siller, K.H., M. Serr, R. Steward, T.S. Hays, and C.Q. Doe. 2005. Live imaging of *Drosophila* brain neuroblasts reveals a role for Lis1/dynactin in spindle assembly and mitotic checkpoint control. *Mol. Biol. Cell.* 16:5127–5140. <http://dx.doi.org/10.1091/mbc.E05-04-0338>
- Sung, H.H., I.A. Telley, P. Papadaki, A. Ephrussi, T. Surrey, and P. Rørth. 2008. *Drosophila* ensconsin promotes productive recruitment of Kinesin-1 to microtubules. *Dev. Cell.* 15:866–876. <http://dx.doi.org/10.1016/j.devcel.2008.10.006>
- Tanenbaum, M.E., and R.H. Medema. 2010. Mechanisms of centrosome separation and bipolar spindle assembly. *Dev. Cell.* 19:797–806. <http://dx.doi.org/10.1016/j.devcel.2010.11.011>
- Tournebise, R., A. Popov, K. Kinoshita, A.J. Ashford, S. Rybina, A. Pozniakovsky, T.U. Mayer, C.E. Walczak, E. Karsenti, and A.A. Hyman. 2000. Control of microtubule dynamics by the antagonistic activities of XMAP215 and XKCM1 in *Xenopus* egg extracts. *Nat. Cell Biol.* 2:13–19.
- Walczak, C.E., and R. Heald. 2008. Mechanisms of mitotic spindle assembly and function. *Int. Rev. Cytol.* 265:111–158. [http://dx.doi.org/10.1016/S0074-7696\(07\)65003-7](http://dx.doi.org/10.1016/S0074-7696(07)65003-7)
- Weis, F., L. Moullintraffort, C. Heichette, D. Chrétien, and C. Garnier. 2010. The 90-kDa heat shock protein Hsp90 protects tubulin against thermal denaturation. *J. Biol. Chem.* 285:9525–9534. <http://dx.doi.org/10.1074/jbc.M109.096586>
- Wittmann, T., H. Boleti, C. Antony, E. Karsenti, and I. Vernos. 1998. Localization of the kinesin-like protein Xklp2 to spindle poles requires a leucine zipper, a microtubule-associated protein, and dynein. *J. Cell Biol.* 143:673–685. <http://dx.doi.org/10.1083/jcb.143.3.673>
- Wodarz, A., and I. Näthke. 2007. Cell polarity in development and cancer. *Nat. Cell Biol.* 9:1016–1024. <http://dx.doi.org/10.1038/ncb433>

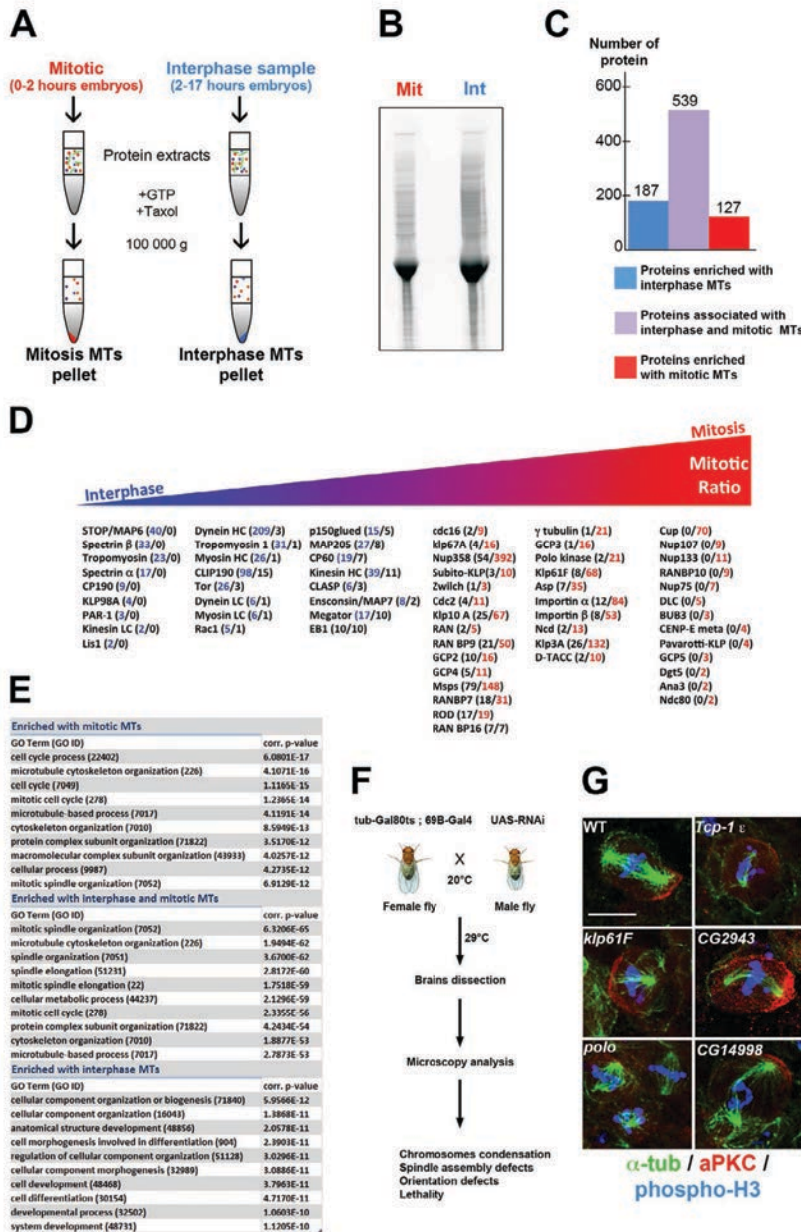


Figure S1. The fly Mt interphasic and mitotic interactomes. (A) Early mitotic (0–2 h) and interphase (2–17 h) embryos were collected for the preparation of mitotic and interphase extracts. These extracts were then supplemented with GTP and taxol and incubated at 25°C to induce Mt assembly. Mts and MAPs were separated by centrifugation through a glycerol cushion and the Mt pellets were resolved by SDS-PAGE. (B) SYPRO Ruby-stained SDS-PAGE protein profiles of the mitotic (Mit) and interphase (Int) Mt pellets before mass spectrometry. (C) The proteins identified were classified into three categories on the basis of their relative amounts in each Mt sample: general (proteins associated with both interphase and mitotic Mts), mitotic, or interphase MAPs (see the Materials and methods section for details). (D) Examples of known proteins identified in the mitotic and interphase Mt pellets. The numbers in parentheses indicate the number of spectral counts identified in the interphase (left number) and mitotic pellets (right number). The corresponding samples were enriched in many relevant mitotic Mt-regulating proteins. (E) Classification of significantly overrepresented biological processes (with the corrected p-value), based on GO Slim annotation terms corresponding to the three different classes of proteins identified in this study. (F) Screening strategy for mitotic genes in the fly CNS. Female flies expressing GAL80^{ts} (GAL4 repressor) and GAL4 ubiquitously in the brain were crossed with males carrying the UAS promoter and downstream sequences for the expression of short hairpin RNAs targeting the genes to be analyzed. At 20°C, GAL80^{ts} inhibits GAL4. However, increasing the temperature to 29°C allows the expression of the dsRNA and protein depletion. After 3 d, the brains were fixed and mitotic abnormalities were detected on squash preparations and by the immunostaining of whole-mount preparations. (G) Mitotic Nbs following RNAi directed against several known (*klp61F*, *polo*) and putative new mitotic genes identified in this study (*Top-1 ϵ* , *CG2943*, *CG14998/Enscosin*). aPKC is shown in red, tubulin in green, and phosphohistone H3 [Ser10] in blue. Bar, 10 μ m.

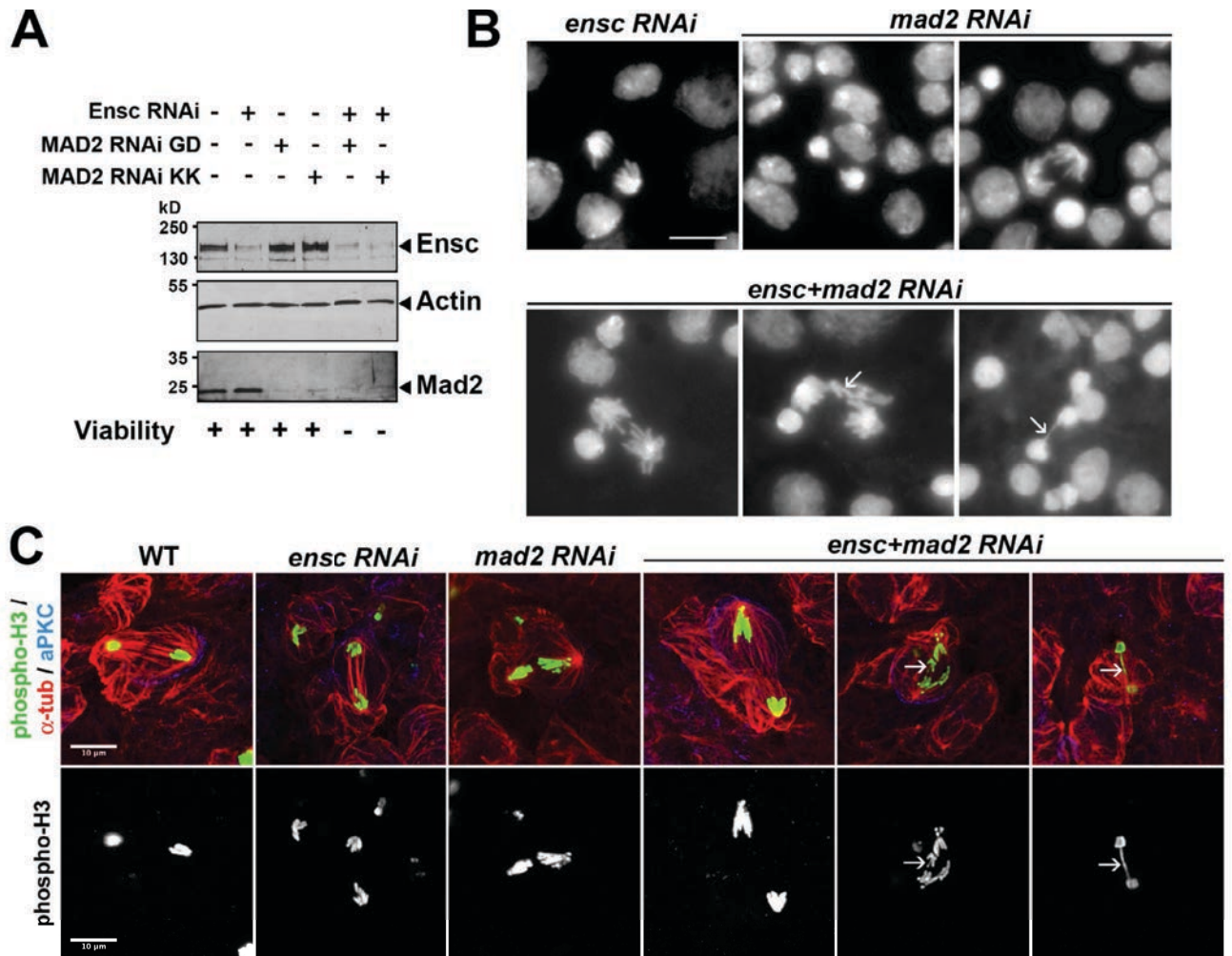


Figure S2. **Mad2 and Ensconsin co-depletion by RNAi induces lagging chromatids during anaphase and telophase.** (A) Western blot showing actin, Ensconsin, and Mad2 protein levels in brain extracts from larvae subjected to various RNAi treatments. RNAi against *Mad2* was performed with two Vienna Drosophila RNAi Center strains (GD and KK). Depletion was efficient for both strains. The viability of the progeny is indicated by a + or - at the bottom of the panel. (B) DAPI-stained squashed preparations of anaphase cells from different RNAi treatments. Arrows show lagging chromosomes after the depletion of both Ensconsin and Mad2. (C) Immunostaining of Nbs during anaphase in cells subjected to RNAi with a control dsRNA or with a dsRNA directed against *Mad2*, *Ensc*, and both *Mad2* and *Ensc* for tubulin (α -tub, in red), phospho-H3 (green and, in the bottom panels, gray), and aPKC (blue). Lagging chromatids were not detected after the depletion of Mad2, which is not essential for chromosome segregation in flies (Buffin et al., 2007). However, chromatid segregation defects were observed following RNAi directed against *Mad2* and *Ensconsin* (arrows). Bar, 10 μ m.

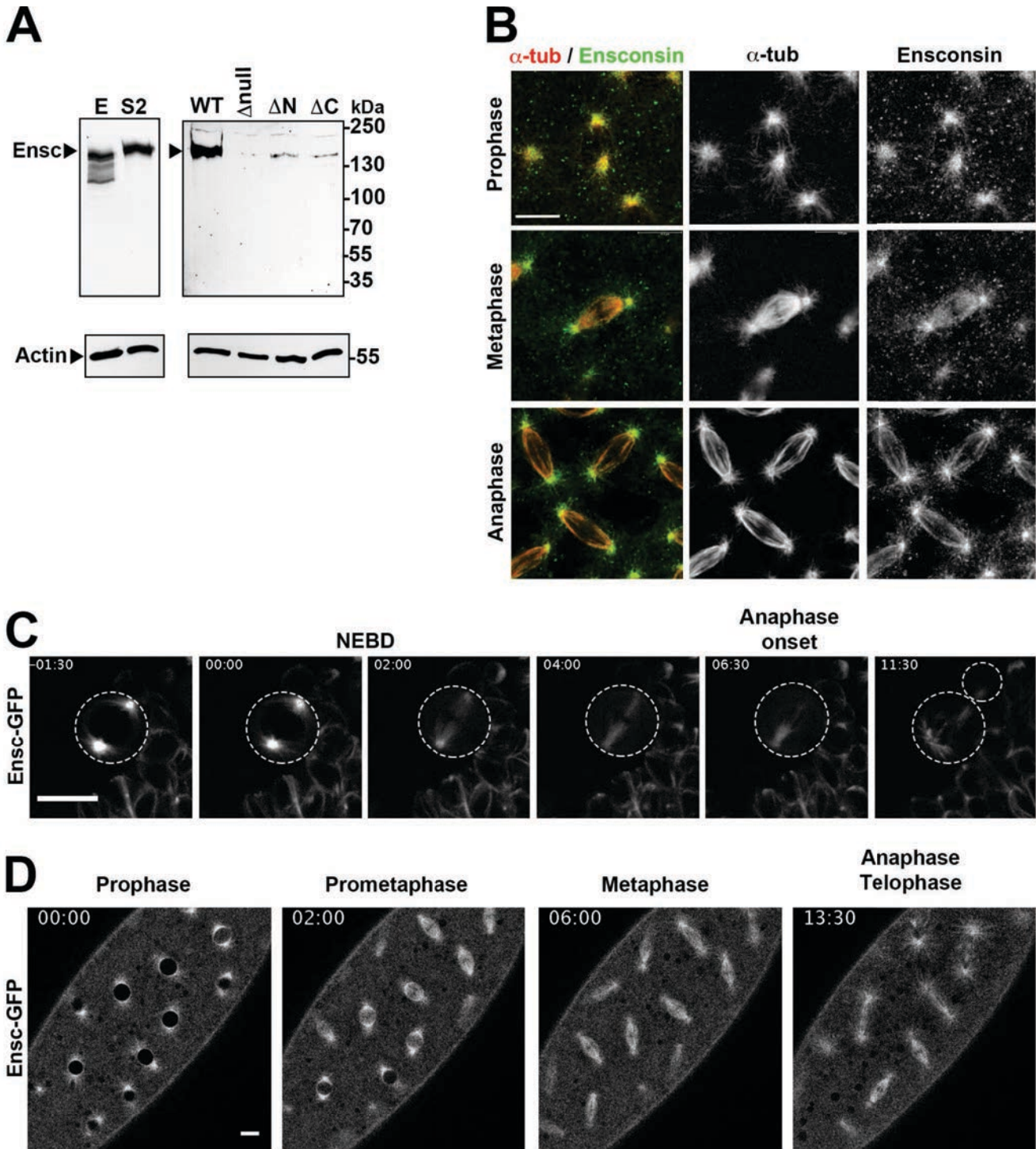
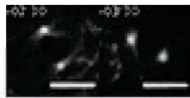


Figure S3. **Ensconsin antibodies, protein levels, and localization in embryonic and somatic tissues.** (A) Western blots with affinity-purified Ensconsin antibodies (top) and actin antibodies (bottom). (left) Lanes E and S2 correspond to embryonic and S2 cell extracts, respectively. (right) Analysis of Ensconsin levels in WT and in various *ensconsin* mutant cells ($\Delta null$, ΔC , ΔN) from brain tissues. Ensconsin protein was undetectable in all homozygous *ensc* mutants and the expected truncated proteins were not detected. (B) Affinity-purified antibodies raised against recombinant Ensconsin were used for the immunological detection of endogenous Ensconsin in syncytial embryos during prophase, metaphase, and anaphase. Ensconsin labeling is shown in green and gray (right), whereas tubulin (α -tub) labeling is shown in red and gray (middle). (C) A functional GFP-tagged Ensconsin (Ensc-GFP) was produced in flies, and it fully restored the viability and rescued the sterility of *ensc* mutant flies. Cell division in Nbs was then monitored by time-lapse video microscopy (see also Video 10). The circles indicate the contours of the cells. (D) Selected images of an embryo expressing one copy of the Ensc-GFP transgene. Bars, 10 μ m.

Table S1. Putative mitotic genes isolated in this study

| FlyBase ID | CG number | Protein name | Human orthologue | | Phenotypes | | | | |
|-------------|-----------|----------------|------------------|---------------|-------------------------|------------------------|------------------------------|------------------------|-----------|
| | | | Protein | UniProt entry | Chromosome condensation | Relative mitotic index | Spindle assembly defects | Orientation defects | Lethality |
| FBgn0039955 | CG41099 | | ANKFY1 | Q9P2R3 | + | + | DTS, short | | |
| FBgn0263594 | CG14648 | Lost | MTHFSD | Q2M296 | + | + | Thin | | |
| FBgn0264693 | CG14998 | Ensconsin | MAP7 | Q14244 | + | + | Short, thin | + (few cells prophase) | |
| FBgn0031070 | CG12702 | | KIAA1524 | Q8TCG1 | + | + | Short | + (weak) | |
| FBgn0051249 | CG31249 | | C14orf166 | Q9Y224 | | + | Variable length | | Adult |
| FBgn0039466 | CG5521 | | | | + | | Short, thick | | |
| FBgn0031985 | CG8683 | mon2 | MON2 | Q7Z3U7 | | – | Variable spindle shape | | P |
| FBgn0037530 | CG2943 | | EMC1 | Q8N766 | + | + | LMT, curved | | P |
| FBgn0037447 | CG2330 | Neurochondrin | NCDN | Q9UBB6 | + | + | Thin, curved | | P |
| FBgn0027509 | CG7261 | TBCD | TBCD | Q9BTW9 | + | + | Short | | P |
| FBgn0261014 | CG2331 | TER94 | VCP | P55072 | + | | Curved, multipolar | | Embryonic |
| FBgn0015019 | CG8977 | Ccty | CCT3 | P49368 | + | + | Short, monopolar, multipolar | | P |
| FBgn0032444 | CG5525 | Tcp-1 δ | CCT4 | P50991 | | + | Short | | L |
| FBgn0010621 | CG8439 | Cct5 | CCT5 | P48643 | + | + | Monopolar | | L |
| FBgn0027329 | CG8231 | Tcp-1 ζ | CCT6A | P40227 | + | + | DTS | | L |
| | | | CCT6B | Q92526 | | | | | |
| FBgn0037632 | CG8351 | Tcp-1 η | CCT7 | Q99832 | + | + | Monopolar, DTS | | L |
| FBgn0033342 | CG8258 | Tcp-1 θ | CCT8 | P50990 | + | + | Short | | |
| FBgn0033055 | CG7861 | TBCE | TBCE | Q15813 | + | + | LMT | | P |

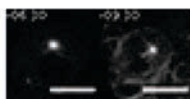
DTS, decrease tubulin signal; LMT, low Mt density (spindle).



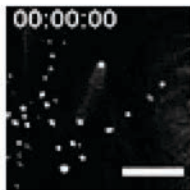
Video 1. **Mitosis in WT Nbs.** The brains of WT flies expressing β -tubulin-GFP were dissected and mounted in Schneider's media. Dividing Nbs were analyzed by spinning-disc confocal microscopy. Z series were acquired every 30 s, with a spinning-disk system mounted on an inverted microscope (Eclipse Ti; Nikon). The time scale is shown in minutes:seconds. Bars, 10 μ m.



Video 2. **Mitosis in *ensc* mutant Nbs.** The brains of *ensc* mutant flies expressing β -tubulin-GFP were dissected and mounted in Schneider's media. Dividing Nbs were analyzed by spinning-disc confocal microscopy. Z series were acquired every 30 s, with a spinning-disk system mounted on an inverted microscope (Eclipse Ti; Nikon). The time scale is shown in minutes:seconds. Bars, 10 μ m.

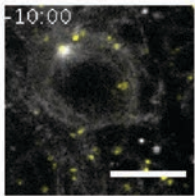


Video 3. **Mitosis in *ensc* Nbs.** The brains of *ensc* mutant flies expressing β -tubulin-GFP were dissected and mounted in Schneider's media. Dividing Nbs were analyzed by spinning-disc confocal microscopy. Z series were acquired every 30 s with a spinning-disk system mounted on an inverted microscope (Eclipse Ti; Nikon). Time is shown as minutes:seconds. Note the severe centrosome separation and positioning defect. Bars, 10 μ m.

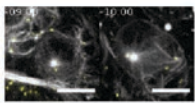


Video 4. **Analysis of centrosome separation between two consecutive mitoses in WT Nbs.** Nbs from WT brains expressing β -tubulin-GFP (for Mt labeling) and asterless-YFP (for centriole labeling). Z series were acquired every 60 s, with a spinning-disk system mounted on an inverted microscope (Eclipse Ti; Nikon). Note that the two centrosomes start to split and separate during cytokinesis. Full separation is achieved before NEBD. The daughter centrosome is immobile on the apical side, retains Mt nucleation capacity, and is inherited by the Nb. The mother centrosome loses its Mt nucleation potential and migrates to the opposite side of the cell and is inherited by the GMC. Time is shown in hours:minutes:seconds. Bar, 10 μ m.

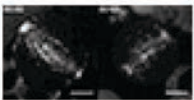
Video 5. **Analysis of centrosome separation between two consecutive mitoses in *ensc* mutant Nbs.** Nbs from *ensc* mutant brains expressing β -tubulin-GFP (for Mt labeling) and asterless-YFP (for centriole labeling). Z series were acquired every 60 s, with a spinning-disk system mounted on an inverted microscope (Eclipse Ti; Nikon). Note that centrosome splitting occurs normally but that full separation does not. The movie on the left shows defective separation but a normal centrosome distribution. The movie on the right shows a cell in which the daughter centrosome (identified on the basis of its stronger Mt nucleation potential) is inherited by the GMC rather than the Nb. In *ensc* mutants, full separation was strongly delayed. Time is shown in hours:minutes:seconds. The green and blue lines follow the trajectories of the daughter and mother centrosomes, respectively. Bar, 10 μ m.



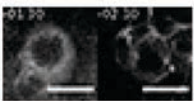
Video 6. **Analysis of centrosome separation in WT Nb.** Nbs from WT brains expressing mCherry- α -tubulin (for Mt labeling, displayed in white) and GFP-Sas4 (for centriole labeling, displayed in yellow). Z series were acquired every 30 s, with a spinning-disk system mounted on an inverted microscope (Eclipse Ti; Nikon). Time is shown in minutes:seconds. Bar, 10 μ m.



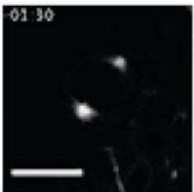
Video 7. **Analysis of centrosome separation and mitotic spindle assembly in *Khc²⁷/khc⁴³* Nbs.** Nbs from WT brains expressing mCherry- α -tubulin (for Mt labeling, displayed in white) and GFP-Sas4 (for centriole labeling, displayed in yellow). Z series were acquired every 30 s, with a spinning-disk system mounted on an inverted microscope (Eclipse Ti; Nikon). Centrosome splitting was normal, but separation was not. The movie on the right shows a cell in which the daughter centrosome (identified on the basis of its stronger Mt nucleation potential) is inherited by the GMC rather than the Nb. Time is shown in minutes:seconds. Bars, 10 μ m.



Video 8. **Analysis of Mt plus end velocity in WT and *ensc* metaphase Nbs.** Nbs from WT (left) and *ensc* mutant brains (right) expressing EB1-GFP (for the labeling of Mt plus ends) were dissected and gently squashed in Schneider's medium before imaging. Images series were acquired every 500 ms, for 1 min, with a spinning-disk system mounted on an inverted microscope (Eclipse Ti; Nikon). Time is shown in minutes:seconds. Bars, 4 μ m.



Video 9. **Mitosis in *sas-4²²¹⁴* and *ensc,sas-4²²¹⁴* mutants.** The brains of *sas-4²²¹⁴* (left) or *ensc,sas-4²²¹⁴* mutant flies (right) expressing β -tubulin-GFP were dissected and mounted in Schneider's medium. Dividing Nbs were analyzed by spinning-disc confocal microscopy. Z series were acquired every 30 s with a spinning-disk system mounted on an inverted microscope (Eclipse Ti; Nikon). Time is shown in minutes:seconds. Note the very short spindle in the *ensc,sas-4²²¹⁴* double mutant. Bars, 10 μ m.



Video 10. **Localization of Ensconsin-GFP during mitosis in Nb.** Brains expressing Ensconsin-GFP (in an *ensc*-null background) were dissected and gently squashed in PBS. Images were acquired every 30 s with a spinning-disk system mounted on an inverted microscope (Eclipse Ti; Nikon). Time is shown as minutes:seconds. Bar, 10 μ m.

Reference

Buffin, E., D. Emre, and R.E. Karess. 2007. Flies without a spindle checkpoint. *Nat. Cell Biol.* 9:565–572. <http://dx.doi.org/10.1038/ncb1570>

Table S2 gives a list of the proteins identified in the fly Mt interactome, and is available as an Excel file.

Table S3 gives a list of the genes screened by RNAi, and is available as an Excel file.

Two supplemental files are available for download as text files.

Supplemental file 1, entitled “trajfilt,” corresponds to the source code of the routine used to filter the trajectories of the Mt ends obtained from the single particle tracking routine available on the Icy image analysis software.

Supplemental file 2, entitled “trajfilt_batch,” corresponds to the source code of the routine which allows batching the filtering of the Mt end trajectories.

Conclusions, discussion & perspectives

I - L'interactome des microtubules de l'embryon de Drosophile et analyse fonctionnelle

A - L'approche protéomique

L'analyse protéomique que nous avons entreprise vient compléter d'autres études réalisées chez la Drosophile (Hughes et al., 2008), le Xénope (Gache et al., 2010) et l'Homme (Sauer et al., 2005; Torres et al., 2011). Notre approche expérimentale peut expliquer la plus grande quantité de protéines que nous avons identifiées par rapport aux autres études.

Par exemple, en 2008, Hughes et collaborateurs ont effectué une approche similaire à la notre avec des embryons âgés de 0 à 4 heures. Cependant, après avoir identifié 592 spots par électrophorèse en gel 2D, ils ont décidé de sélectionner seulement 300 spots pour la spectrométrie de masse (Hughes et al., 2008). Notre approche expérimentale présente donc plusieurs avantages : la comparaison entre mitose et interphase, une plus grande étendue des stades de développement des embryons, l'identification d'interactions certainement plus directes (concentration de détergent 5 fois supérieure) et enfin, nous avons choisi une approche à l'aveugle car l'intégralité des culots a été envoyé en spectrométrie de masse. En comparant les 270 protéines identifiées en spectrométrie de masse lors de l'étude de 2008 et les 855 que nous avons identifiées, 156 sont communes.

B - Le crible par ARNi

Nous avons choisi de réaliser l'analyse fonctionnelle des candidats par ARNi dans le SNC larvaire. Des approches similaires ont déjà été réalisées chez la Drosophile, utilisant le système UAS-Gal4 pour identifier de nouveaux régulateurs de la voie la Notch dans le développement des organes sensoriels (Le Bras et al., 2012; Mummery-Widmer et al., 2009) ou encore les gènes impliqués dans la régulation de l'homéostasie d'auto-renouvellement des neuroblastes (Carney et al., 2012; Neumuller et al., 2011). Pour notre approche, nous avons décidé d'exprimer Gal4 sous l'influence du promoteur 69B. Ce promoteur permet une expression forte dans toutes les cellules du système nerveux central et pas seulement les neuroblastes. De plus, les phénotypes observés après trois jours d'induction de la déplétion correspondent aux phénotypes mutants des contrôles que nous avons utilisés : la déplétion d'Eg5/Klp61F résulte en la formation de fuseaux monopolaires (Heck et al., 1993), la déplétion de la kinase Polo délocalise aPKC et entraîne des fuseaux anastraux (Donaldson et al., 2001; Wang et al., 2007) et les déplétions de Brat et Prospero provoquent une augmentation de la taille des lobes du SNC (Bello et al., 2006) (non montré).

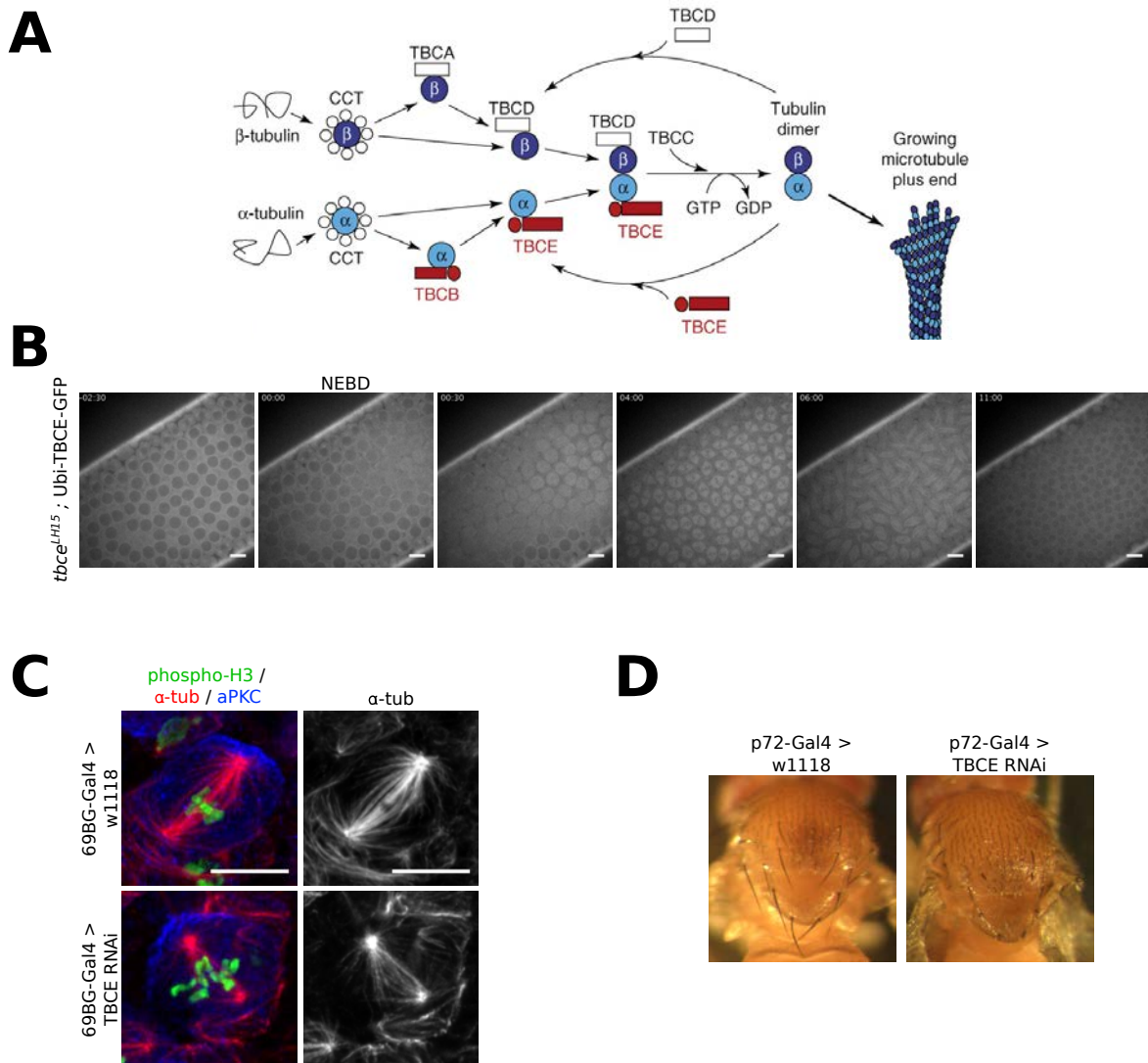


Figure 16 : TBCE, un autre candidat prometteur.

A. TBCE est une des chaperonnes impliquées dans le repliement de de l' α -tubuline et la formation des dimères α/β -tubuline. TBCE possède un domaine CAP-Gly suggérant une association aux microtubules. Schéma adapté de Steinmetz & Akhmanova, 2008 **B.** Le transgène Ubi-TBCE-GFP restaure la viabilité du mutant de délétion *tbce^{LH15}* (Jin et al., 2009) et la protéine de fusion décore le fuseau pendant tout le mitose. 30 secondes après la rupture de l'enveloppe nucléaire (NEBD, 00:00) TBCE est fortement enrichi dans le vestige du noyau. La barre représente 10 μ m. **C.** La déplétion par ARNi de TBCE dans le SNC entraîne un défaut d'assemblage du fuseau mitotique des neuroblastes. Seuls quelques faisceaux de microtubules sont visibles, menant à des fuseaux fins. La barre représente 10 μ m. **D.** La perte de fonction de TBCE dans les SOP désorganise le réseau de microtubule de la partie cytoplasmique externe des cellules soie, réduisant considérablement leur longueur.

Enfin, l'utilisation de l'inhibiteur thermosensible de Gal4, Gal80^{ts}, nous permet d'induire la déplétion après le développement embryonnaire, et donc d'éviter une létalité trop précoce. Ceci nous a permis, dans une large majorité des cas, de pouvoir prélever le SNC à un stade où il est suffisamment développé pour être fixé avant l'étape de microscopie.

C - Les candidats mis en évidence

Parmi les 18 candidats sélectionnés sur la base de leur interaction aux microtubules, particulièrement en mitose, et de leur phénotype mitotique, d'autres candidats se sont montrés potentiellement intéressants comme par exemple la chaperonne de tubuline TBCE (TuBulin specific Chaperone E). Par l'approche protéomique, nous avons déterminé que TBCE est exclusivement associée aux microtubules mitotiques (4 peptides en mitose contre 0 en interphase).

TBCE est impliquée dans la voie de repliement et dimérisation de l' α -tubuline, particulièrement à l'étape de formation des dimères α/β -tubuline. Elle est également impliquée, avec TBCD dans la dissociation des dimères pour la destruction ou le recyclage de la tubuline (Steinmetz and Akhmanova, 2008) (figure 16A). La protéine TBCE possède un domaine CAP-Gly, suggérant une association avec les microtubules. Chez la Drosophile, CG7861/TBCE a été montré comme impliquée dans la polymérisation des microtubules et la croissance axonale (Jin et al., 2009). De plus, sa perte de fonction réduit considérablement la formation du réseau de microtubules, sans pour autant affecter le niveau d' α -tubuline. Enfin, pour une autre chaperonne de la tubuline, TBCD, connue pour la formation des dimères α/β -tubuline avec TBCE, il a été publié qu'elle est étroitement associée aux centrosomes et impliquée dans le recrutement du γ -TuRC. En effet, sa surexpression réduit la quantité de γ -TuRC associé aux centrosomes, affecte la localisation de protéines centrosomales (GCP-WD, Centrine et Péricentrine), ce qui diminue la taille des asters de microtubules. Enfin sa déplétion entraîne fragmentation et amplification des centrosomes, menant à des fuseaux multipolaires (Cunningham and Kahn, 2008).

Nous avons donc entamé l'étude de cette protéine au cours de la mitose. Avec une lignée de Drosophile transgénique, exprimant une protéine de fusion TBCE-GFP, capable de sauver la viabilité du mutant de délétion, nous avons montré que TBCE décore le fuseau mitotique dans l'embryon et le neuroblaste mais pas les asters en interphase (Figure 16 B, embryon). Ceci semble confirmer l'absence de localisation sur les microtubules observée par Jin et collaborateurs qui ont décrit une localisation cytoplasmique en interphase. Nous avons également testé l'effet de la perte de fonction de TBCE dans deux systèmes : l'assemblage du fuseau dans les neuroblastes et l'effet sur la formation des soies des organes mécano-sensorielles du thorax. Pour cela, nous avons utilisé le

système UAS-Gal4 permettant l'induction de l'ARNi dans le SNC et les précurseurs d'organes sensoriels et leurs lignages (avec les transgènes 69B-Gal4 et p72-Gal4 respectivement). Nous avons utilisé deux lignées commerciales (VDRC) exprimant les séquences d'ARNi sous le contrôle d'UAS et observé les phénotypes dans la génération F1.

Dans le système nerveux central, la perte de fonction de TBCE semble entraîner une augmentation du nombre de cellules positives pour phospho-Histone H3 (non montrée) et donc une possible augmentation de l'index mitotique due à l'activation prolongée du SAC. Au niveau cellulaire, la déplétion de TBCE entraîne un sévère phénotype d'assemblage des fuseaux : ils sont particulièrement fins et composés uniquement de larges faisceaux de microtubules (figure 16C).

Au niveau du thorax de la mouche adulte, la partie externe du cytoplasme de la cellule « shaft » ou soie (une des cinq cellules composant un organe sensoriel) qui constitue la soie est chargée de microtubules courts avec un enrichissement des extrémités (-) au niveau de l'extrémité de la soie (Bitan et al., 2010). L'organisation du réseau de microtubules est donc primordiale pour l'élongation polarisée et rectiligne des soies. Lors de la déplétion de TBCE, la longueur des soies est très fortement diminuée (figure 16D).

Les résultats sur cette protéine et sa fonction au cours de la mitose sont pour l'instant très préliminaires mais les phénotypes observés après déplétion sur l'organisation du réseau de microtubules (autant en mitose qu'en interphase) sont prometteurs. De plus, ceci valide l'efficacité de notre approche visant à identifier de nouvelles MAPs impliquées dans la dynamique des microtubules et l'assemblage du fuseau mitotique.

Pour finir, un autre candidat présentant un phénotype mitotique lors de notre crible, TER94/Cdc48, a récemment été montré comme impliqué dans la maturation des centrosomes dans l'embryon précoce de *C. elegans*. En limitant le recrutement d'Aurora A aux centrosomes, par l'intermédiaire de son adaptateur de substrats UBXN-2, cette AAA-ATPase empêche la maturation trop précoce des centrosomes et participe à l'orientation du fuseau. Cette régulation d'Aurora A semble par ailleurs conservée en cellules humaines (Kress et al., 2013).

II - le rôle d'Enscosine dans la dynamique des microtubules

Nous l'avons démontré par différentes approches (suivi de comètes EB1-GFP, surexpression en cellules S2, analyse de la vitesse de polymérisation *in vitro* par turbidité), Ensconsine est véritablement impliquée dans la polymérisation et stabilité des microtubules. Cette MAP est très conservée, particulièrement au niveau de ses domaines EHR1 et EHR2, qui sont respectivement impliqués dans la liaison aux microtubules et à la Kinésine-1 (Figure 17A). En surexprimant en cellules S2 les protéines de fusion Ensconsine-GFP, et les protéines tronquées N-term-GFP et C-term-GFP (Figure 17A et C), nous avons confirmé que c'est bien le domaine N-terminal d'Ensconsine qui est nécessaire et suffisant à sa localisation aux microtubules, en interphase comme en mitose. Cependant, alors que la surexpression d'Ensconsine-GFP entraîne la formation de faisceaux de microtubules très intenses en interphase et induit des fuseaux allongés en mitose, la surexpression du domaine N-terminal seul ne provoque aucun de ces effets.

Plusieurs hypothèses doivent être testées pour comprendre les différences observées sur la dynamique des microtubules lors des surexpressions d'Ensconsine pleine longueur ou de son domaine N-terminal. Tout d'abord, il faudra tester si Ensconsine est capable de former des oligomères par son domaine C-terminal (EHR2) ou par la région intermédiaire. Ceci pourrait expliquer la formation des faisceaux de microtubules en interphase car une forme dimérisée d'Ensconsine pourrait entraîner le pontage entre microtubules. Cette propriété de dimérisation peut être testée par chromatographie d'exclusion à partir d'une protéine recombinante purifiée. Cette protéine purifiée nous permettra également d'analyser par microscopie VE-DIC (Video-Enhanced Differential Interference Contrast) l'effet d'Ensconsine sur la dynamique de microtubules nucléés par des centrosomes purifiés (Vitre et al., 2008) ; ou encore de faire de la microscopie TIRF (Total Internal Reflection Fluorescence). Ceci nous permettra d'obtenir plus d'informations sur le comportement des microtubules en présence d'Ensconsine et de valider *in vitro* si la vitesse de polymérisation mais aussi d'autres paramètres (fréquence des catastrophes, vitesse dépolymérisation, fréquence des sauvetages, temps de pause) dépendent d'Ensconsine.

La surexpression d'Ensconsine dans le SNC larvaire (Figure 17B) nous a également révélé quelques informations : tout d'abord, bien que ceci n'est pas été quantifié, les fuseaux sont allongés, comme en cellules S2 ; ensuite, Ensconsine semble en partie exclue des microtubules tout au long de la mitose (Figure 17B, astérisques). Ceci est en adéquation avec l'étude montrant que la liaison de E-MAP-115 aux microtubules est régulée par un état de phosphorylation qui varie au cours du cycle cellulaire (Masson and Kries, 1995) car son hyper-phosphorylation en mitose corrèle avec son exclusion partielle des microtubules. Ensconsine pourrait donc être la cible d'une régulation fine pour

sa liaison aux microtubules, ceci dans le but de réguler la dynamique des microtubules par le contrôle de la vitesse de polymérisation. Ce même genre de régulation a déjà été observé. Par exemple, Aurora A phosphoryle p150^{glued} qui est alors partiellement exclu des microtubules en mitose, ce qui est nécessaire à l'assemblage du fuseau métaphasique et du fuseau central (Reboutier et al., 2013; Romé et al., 2010). De plus, au moins une kinase a été rapportée comme pouvant phosphoryler Ensconsine : Par-1 dans la lignée germinale femelle (Sung et al., 2008). Cependant, aucune fonction de Par-1 n'a été décrite dans le neuroblaste jusqu'à présent.

Enfin, nous avons montré que les neuroblastes mutants pour *ensconsine* présentent des fuseaux courts et un temps de mitose allongé. Ceci est le résultat d'une polymérisation des microtubules altérée qui rend l'assemblage du fuseau moins efficace et prolonge l'activité du SAC pour permettre à la cellule de réparer les erreurs d'attachements kinétochores-microtubules. Nous avons confirmé l'importance du SAC lors de la double déplétion d'Ensconsine et Mad2 par ARNi pour la viabilité des Drosophiles mais également pour la division cellulaire. Il faut noter que la mitose chez la Drosophile est particulièrement robuste car dans un contexte normal, le SAC n'est pas requis pour la viabilité, certainement de par le faible nombre de chromosomes à ségréger. En effet, les mutants de perte de fonction pour Mad2 ou pour le domaine KEN de BubR1 sont viables (Buffin et al., 2007; Rahmani et al., 2009). La Drosophile pourrait donc constituer un modèle de choix pour rechercher de nouveaux régulateurs de la mitose dans un contexte sensibilisé où le SAC est défectueux et révéler des gènes essentiels à la ségrégation des chromosomes dans des organismes plus complexes comme les mammifères.

Enfin, aucun phénotype mitotique n'a été rapporté lors de la perte de fonction de MAP7 chez les mammifères, probablement car les gènes codant pour les protéines MAP7D1, 2 et 3 assurent une redondance fonctionnelle.

III - La Kinésine-1, partenaire fonctionnel d'Enscosine

A - Vers une meilleure compréhension des fonctions des domaines EHR1 et EHR2 d'Enscosine et du lien avec la Kinésine-1

Deux des études publiées sur la fonction d'Enscosine obtiennent des données contradictoires sur la viabilité et l'expression de formes tronquées d'Enscosine par rapport à ce que nous avons pu observer avec ces mêmes lignées (Barlan et al., 2013 ; Sung et al., 2008). Trois lignées mutantes nous ont été fournies : un mutant de délétion totale (*ensΔ*), un mutant de délétion pour une grande partie de la région 3' (*ensΔC*), englobant le domaine EHR2, et un mutant de délétion en 5' censé exprimer la partie C-terminale (*ensΔN*) (Sung et al., 2008). Il a été publié que le mutant *ensΔ* est complètement létal, alors que le mutant *ensΔN* présente une survie jusqu'au stade adulte de plus de 30% et une fertilité permettant de maintenir l'homozygotie. Le mutant *ensΔC* a une survie plus faible (environ 25%) et les adultes meurent rapidement (Barlan et al., 2013). Cependant, nous avons observé que ces trois mutants sont quasiment indistinguables et la très grande majorité des individus meurent avant d'atteindre le stade adulte (*ensΔ* et *ensΔC*) et les quelques survivants sont stériles pour *ensΔN*. De même, il nous a été impossible de confirmer, par Western Blot sur des SNC larvaires, la présence de formes tronquées pour les mutants *ensΔN* et *ensΔC* alors que nos anticorps détectent les domaines EHR1 et EHR2. Ces trois lignées semblent donc toutes porter des délétions qui ne permettent pas l'expression d'Enscosine, ni de formes tronquées. C'est pourquoi, il serait intéressant d'essayer de compléter le mutant *ensΔ* par des transgènes exprimant le N- ou le C-terminal couplé à la GFP et de voir l'impact sur (1) la viabilité des individus, (2) la dynamique des microtubules et l'assemblage du fuseau et (3) la ségrégation des centrosomes (voir la partie suivante). Ceci nous permettrait de générer des lignées de mouches « séparation de fonctions », si les fragments d'Enscosine sauvent l'une ou l'autre de ces deux fonctions.

Il a été publié qu'en cellules S2, le domaine EHR2 est nécessaire et suffisant pour activer la Kinésine-1 (Barlan et al., 2013). Cette kinésine serait impliquée dans le glissement des microtubules les uns par rapport aux autres, affectant la forme de la cellule (Jolly and Gelfand, 2010; Jolly et al., 2010). Les faisceaux de microtubules que nous observons lors de la surexpression de la protéine pleine longueur pourraient donc être expliqués par une trop forte activation de la Kinésine-1. En effet, en se liant aux microtubules par son domaine EHR1, Enscosine pourrait recruter et activer Kinésine-1 de façon incontrôlée induisant les faisceaux de microtubules visibles en interphase en cellules S2 et dans les neuroblastes (Figure 17B, flèche et 17C, gauche).

Il n'est cependant pas à exclure qu'Enscosine, par son domaine C-terminal puisse recruter d'autres partenaires que la Kinésine-1 sur les microtubules. Cependant à ce jour, aucune protéine n'a été décrite comme associée à Enscosine pour une telle fonction. Des expériences de chromatographie d'affinité seraient sans doute à envisager pour identifier d'autres potentiels interacteurs et répondre à cette question.

B - Le rôle de Kinésine-1 et Enscosine dans la dynamique des centrosomes

1 - Une fonction indépendante de la dynamique des microtubules

Pour rappel, dans un contexte sauvage, le centrosome fils garde son pouvoir de nucléation et reste ancré au pôle apical tout au long du cycle alors que le centrosome père est hautement mobile dans la cellule et ne nucléé pas ou peu de microtubules jusqu'aux dernières minutes avant la rupture de l'enveloppe nucléaire, lorsqu'il a atteint le pôle basal (Conduit and Raff, 2010; Januschke et al., 2011; Rebollo et al., 2007; Rusan and Peifer, 2007). Au cours de notre étude, nous avons montré que la perte de fonction d'Enscosine entraîne un défaut de séparation des centrosomes durant l'interphase et ceci résulte en une répartition aléatoire dans les deux cellules filles à l'issue de la mitose. Nous avons décidé de regarder l'impact de la perte de fonction de la Kinésine-1, dont Enscosine est le partenaire fonctionnel en interphase (Barlan et al., 2013; Metzger et al., 2012; Sung et al., 2008). Nous avons donc confirmé que la Kinésine-1 n'est pas impliquée en mitose (Saxton et al., 1991), sa perte de fonction n'affectant ni la longueur du fuseau, ni le temps de mitose. En revanche, les mutants *khc* phénotypent les mutants *enscosine* pour leurs défauts de séparation et distribution des centrosomes. Les fonctions d'Enscosine dans la régulation de la longueur du fuseau et la séparation des centrosomes sont donc séparables, la seconde étant partagée avec la Kinésine-1 et la première en étant indépendante.

La différence de nucléation des centrosomes au cours de l'interphase étant un marqueur fidèle pour discerner le fils du père, nous n'avons pas vérifié des marqueurs tels que PACT, la Centrobine, la Centrosomine ou encore PLP (Conduit and Raff, 2010; Januschke et al., 2013; Lerit and Rusan, 2013). Mais il serait cependant intéressant de regarder ces marqueurs car chez *C. elegans*, il a été montré que la Kinésine-1 empêche le recrutement du PCM sur les centrioles amené par le spermatozoïde lors de la fécondation. Ceci prévient la capture du fuseau méiotique par les asters issus de l'entrée du spermatozoïde et donc la triploïdie (McNally et al., 2012). Cette hypothèse est cependant peu probable car nous n'avons pas noté de maturation précoce du centrosome père dans les mutants *khc*.

2 - La Kinésine-1 et l'ancrage des centrosomes à l'enveloppe nucléaire

La Kinésine-1 est un moteur moléculaire dirigé vers les extrémités (+) des microtubules. Il a été montré chez les mammifères que cette kinésine est impliquée dans le positionnement des centrosomes par rapport au noyau en exerçant des forces opposées à la Dynéine, dirigée vers les extrémités (-) (Tanenbaum et al., 2011).

Comme la Dynéine, la Kinésine-1 est capable de s'associer à l'enveloppe nucléaire par deux voies qui seront décrites plus loin. Ces deux moteurs permettraient de maintenir un équilibre des forces : la Dynéine a tendance à tirer le noyau et les centrosomes les uns vers les autres, et la kinésine aurait plutôt tendance à les éloigner. En effet, lors de la perte de fonction de la Dynéine par injection d'anticorps bloquants, les centrosomes et le noyau restent étroitement associés puis sont séparés et envoyés aux pôles opposés de la cellule environ une heure avant le début de la mitose, suggérant un transport actif et non une diffusion passive. En effet, en inhibant la Kinésine-1 en plus de la Dynéine, cette séparation active est éliminée (Splinter et al., 2010). Cette étude a montré que ces deux moteurs sont associés à la membrane nucléaire par Bicaudal D2, lui-même associés aux complexes des pores nucléaires. Les auteurs proposent que la Dynéine prenne le pas sur la Kinésine-1, ce qui résulterait en l'association des centrosomes aux noyaux.

La seconde voie d'ancrage de ces moteurs à l'enveloppe nucléaire passe par la voie des protéines contenant les domaines SUN (Sad1 and UNC-84) qui recrute les protéines avec des domaines KASH (Klarsicht, ANC-1 and Syne/Nesprin homology) comme Nesprin-2 qui lie à son tour la Dynéine et la Kinésine-1 (Schneider et al., 2011). Dans cette seconde étude, la déplétion de la chaîne légère de la Kinésine-1 induit un décrochage des centrosomes de l'enveloppe nucléaire, ce qui va à l'encontre de l'article publié par Splinter et collaborateurs. En effet, ils montraient que cette kinésine est responsable de la séparation active des centrosomes et du noyau.

En conclusion, le mécanisme et le rôle exact de Kinésine-1 dans l'ancrage des centrosomes au noyau sont peu documentés et très mal connus. Lors de la perte de fonction de *khc* dans le SNC larvaire, nous n'avons cependant pas noté de défauts d'ancrage des centrosomes à la membrane nucléaire. Tanenbaum et collaborateurs proposent que l'activation de la Kinésine-1 environ 1h avant la mitose servirait à contrecarrer l'action de la Dynéine. En effet, celle-ci favorisant l'association noyau-centrosomes, ceci pourrait entraîner des frictions qui ralentiraient la séparation des centrosomes. Le rôle de la Kinésine-1 serait de relâcher l'ancrage des centrosomes à l'enveloppe nucléaire et favoriser leur séparation (Tanenbaum et al., 2011). Ceci expliquerait le défaut de séparation de centrosomes que nous avons observé dans les neuroblastes de larves mutantes pour *khc*.

3 - Parallèle avec les cellules souches de la lignée germinale mâle

Les protéines interagissant par leurs domaines SUN et KASH ont également été proposées comme faisant partie du lien entre le centrosome père et une chromatide sœur spécifique lors de la division des cellules souches germinales mâles chez la *Drosophile* (Yamashita, 2013).

Dans ces cellules, le centrosome père est hérité par la cellule souche (à l'inverse du neuroblaste) (Yamashita et al., 2007). De plus, il s'avère que les chromatides sœurs des chromosomes sexuels ne sont pas aléatoirement distribuées entre les deux cellules filles (Yadlapalli and Yamashita, 2013). En effet pour les chromosomes X et Y, dans 85% des cas, c'est la même sonde de FISH (Fluorescence In Situ Hybridization) qui est retenue par la cellule souche. Cependant, par incorporation de BrDU prolongée, les auteurs ont établi que ce n'est pas le modèle du brin « immortel » retenu pour toujours par la cellule souche qui a lieu mais plutôt un modèle où le changement de brin apparaît toutes les 7 divisions environ. Ceci semble dépendre notamment des centrosomes, des interactions SUN-KASH et du potentiel prolifératif inhérent aux cellules souches (Yadlapalli and Yamashita, 2013).

Yamashita propose que cette ségrégation non-aléatoire des chromatides des chromosomes X et Y participe à transmettre des marques épigénétiques distinctes entre les deux cellules filles. Il propose également que les deux chromatides sœurs puissent posséder des kinétochores avec des activités de liaison ou d'organisation des microtubules différentes, permettant un choix du centrosome par lesquels ils sont capturés (Yamashita, 2013).

Quelque soit la part de réalité dans ce modèle, il pourrait être intéressant d'étudier si une telle ségrégation non-aléatoire des chromatides sœurs existe dans le cas du neuroblaste. Si tel est le cas, la perte de fonction de *khc* constituerait un excellent modèle d'étude pour vérifier si l'héritage aléatoire des centrosomes entre les deux cellules filles à l'issue de la division d'un neuroblaste peut perturber la ségrégation non-aléatoire des chromatides sœurs, et pourquoi pas le lignage du neuroblaste.

4 - Le positionnement des asters et la fidélité de l'orientation l'axe de division

Lors de l'analyse de la dynamique des centrosomes des mutants *khc*, nous avons quelques fois pu observer une mauvaise localisation des deux centrosomes induisant un mouvement important pendant les quelques minutes avant la rupture de l'enveloppe nucléaire leur permettant de rejoindre aléatoirement le pôle apical ou basal. Ceci vient quelque peu à l'encontre du travail publié par Januschke & Gonzalez (Januschke and Gonzalez, 2010) montrant que l'aster apical dicte l'axe de division.

Il sera intéressant d'analyser l'établissement de l'axe de polarité, notamment par le suivi du complexe Par (comme Bazooka/Par3) ou du module d'ancrage du fuseau (comme Pins ou Dlg) dans les mutants *ensconsine* et *khc*. Nous pourrions ainsi vérifier si le centrosome fils dicte bel et bien l'établissement de la polarité avant de se positionner à l'un des pôles ou si un autre signal participe à cette fidélité de l'axe de division d'un cycle à l'autre. D'autant plus qu'indépendamment de la cellule par lequel le centrosome fils est hérité, nous avons remarqué pour quelques neuroblastes mutants pour *khc* se divisant deux fois au cours d'une même expérience que la fidélité de l'axe division est compromise (6 fois sur 9) et peut varier d'environ 30 à 90°. Ceci malgré une nucléation du centrosome fils comparable aux cas contrôles.

5 - La perte de fonction d'Ensconsine favorise l'intégrité des pôles des fuseaux acentriolaires

Enfin nous avons montré que la perte de fonction d'Ensconsine dans un contexte acentrosomal (mouches mutantes pour *sas-4*) diminue la longueur des fuseaux et allonge quelque peu le temps de mitose. L'effet cumulé de ces deux mutations n'est cependant pas drastique pour la division cellulaire. De plus, il est apparu que les fuseaux de ces doubles mutants présentent des pôles mieux définis que dans le mutant *sas-4* seul et que dans certains neuroblastes, nous pouvions voir en vidéomicroscopie de petits asters capables de se focaliser aux pôles du fuseau.

Ces pseudo-asters rappellent ceux décrits par Moutinho-Pereira et collaborateurs. Dans cette étude, ils décrivent une lignée de cellules de Drosophile appelée 1182-4D qui est constitutivement acentriolaire (Moutinho-Pereira et al., 2009). Cette lignée de cellule présente aux pôles de ses fuseaux des pseudo-asters dont la taille est réduite par rapport aux centrosomes des cellules S2, et qui sont capables de retenir des éléments du PCM comme la Centrosomine, PLP, Sas-4 et la γ -tubuline. La formation, l'architecture et la fonction de ces pseudo-asters seraient contrôlées par la Centrosomine, Msps/XMAP215 et la kinésine-13 Klp10A. De plus, leur transport aux pôles semble médié par NCD et la Dynéine.

Dans le double mutant pour *ensconsine* et *sas-4*, ces pseudo-asters sont présents et mieux visibles que dans le mutant *sas-4*. Ceci pourrait expliquer la meilleure intégrité des pôles du fuseau par rapport au simple mutant *sas-4*. Il est possible que la déplétion d'Ensconsine, en affectant la stabilité des microtubules, entraîne la formation de microtubules plus courts, probablement plus favorables à la formation de telles structures. Les microtubules plus courts pourraient permettre de concentrer plus efficacement le PCM et donc les pôles du fuseau via les moteurs moléculaires comme NCD et le DDC. Notre hypothèse est donc que dans un contexte acentriolaire, la perte de

fonction d'Enscosine compromet les attachements kinétochores-microtubules mais ceci pourrait être contrebalancé par une meilleure intégrité des pôles. Ceci expliquerait pourquoi la durée de mitose dans le double mutant n'est pas beaucoup plus longue que dans le simple mutant *sas-4*.

IV - Conclusions générales

En conclusion, mes travaux de thèse ont permis, par une approche protéomique et fonctionnelle visant à découvrir de régulateurs la dynamique des microtubules et de l'assemblage du fuseau, d'identifier un nouveau rôle pour la protéine Enscosine/MAP7. Capable seule de promouvoir la polymérisation des microtubules, elle est essentielle à la ségrégation des chromosomes en l'absence du point de contrôle de l'assemblage du fuseau mitotique. Nous avons aussi montré que son partenaire, la Kinésine-1, partage sa fonction dans la dynamique et la ségrégation des centrosomes. De nombreuses études ont montré que les centrosomes sont intrinsèquement différents de par leur pouvoir de nucléation. Cette différence n'est cependant pas suffisante pour expliquer leur ségrégation. Ils doivent pour cela entamer dès la fin de la mitose leur séparation par un mécanisme dépendant de la Kinésine-1 et d'Enscosine.

Cette étude ouvre de nouvelles questions sur le rôle précis de chacun des domaines d'Enscosine mais également sur le rôle de Kinésine-1 dans la séparation et la ségrégation des centrosomes, la fidélité de l'axe de division et les éventuelles conséquences sur le lignage des cellules souches du SNC larvaire de la Drosophile.

Références Bibliographiques

- Akhmanova, A., and M.O. Steinmetz. 2010. Microtubule +TIPs at a glance. *J Cell Sci.* 123:3415-3419.
- Al-Bassam, J., and F. Chang. 2011. Regulation of microtubule dynamics by TOG-domain proteins XMAP215/Dis1 and CLASP. *Trends Cell Biol.* 21:604-614.
- Al-Bassam, J., H. Kim, G. Brouhard, A. van Oijen, S.C. Harrison, and F. Chang. 2010. CLASP promotes microtubule rescue by recruiting tubulin dimers to the microtubule. *Dev Cell.* 19:245-258.
- Al-Bassam, J., R.S. Ozer, D. Safer, S. Halpain, and R.A. Milligan. 2002. MAP2 and tau bind longitudinally along the outer ridges of microtubule protofilaments. *J Cell Biol.* 157:1187-1196.
- Albee, A.J., W. Tao, and C. Wiese. 2006. Phosphorylation of maskin by Aurora-A is regulated by RanGTP and importin beta. *J Biol Chem.* 281:38293-38301.
- Anders, A., and K.E. Sawin. 2011. Microtubule stabilization in vivo by nucleation-incompetent gamma-tubulin complex. *J Cell Sci.* 124:1207-1213.
- Antonio, C., I. Ferby, H. Wilhelm, M. Jones, E. Karsenti, N.A. R., and I. Vernos. 2000. Xkid, a Chromokinesin Required for Chromosome Alignment on the Metaphase Plate. *Cell.* 102:425-435.
- Arnal, I., C. Heichette, G.S. Diamantopoulos, and D. Chretien. 2004. CLIP-170/tubulin-curved oligomers coassemble at microtubule ends and promote rescues. *Curr Biol.* 14:2086-2095.
- Atwood, S.X., and K.E. Prehoda. 2009. aPKC phosphorylates Miranda to polarize fate determinants during neuroblast asymmetric cell division. *Curr Biol.* 19:723-729.
- Bakhom, S.F., S.L. Thompson, A.L. Manning, and D.A. Compton. 2009. Genome stability is ensured by temporal control of kinetochore-microtubule dynamics. *Nat Cell Biol.* 11:27-35.
- Barlan, K., W. Lu, and V.I. Gelfand. 2013. The microtubule-binding protein ensconsin is an essential cofactor of kinesin-1. *Curr Biol.* 23:317-322.
- Basto, R., J. Lau, T. Vinogradova, A. Gardiol, C.G. Woods, A. Khodjakov, and J.W. Raff. 2006. Flies without centrioles. *Cell.* 125:1375-1386.
- Basto, R., F. Scaerou, S. Mische, E. Wojcik, C. Lefebvre, R. Gomes, T. Hays, and R. Karess. 2004. In Vivo Dynamics of the Rough Deal Checkpoint Protein during Drosophila Mitosis. *Current Biology.* 14:56-61.
- Bayraktar, O.A., J.Q. Boone, M.L. Drummond, and C.Q. Doe. 2010. Drosophila type II neuroblast lineages keep Prospero levels low to generate large clones that contribute to the adult brain central complex. *Neural Dev.* 5:26.
- Bechstedt, S., and G.J. Brouhard. 2013. Motors and MAPs collaborate to size up microtubules. *Dev Cell.* 26:118-120.
- Bello, B., H. Reichert, and F. Hirth. 2006. The brain tumor gene negatively regulates neural progenitor cell proliferation in the larval central brain of Drosophila. *Development.* 133:2639-2648.
- Bello, B.C., N. Izergina, E. Caussinus, and H. Reichert. 2008. Amplification of neural stem cell proliferation by intermediate progenitor cells in Drosophila brain development. *Neural Dev.* 3:5.
- Belmont, L.D., and T.J. Mitchison. 1996. Identification of a Protein That Interacts with Tubulin Dimers and Increases the Catastrophe Rate of Microtubules. *Cell.* 84:623-631.
- Betschinger, J., K. Mechtler, and J.A. Knoblich. 2006. Asymmetric segregation of the tumor suppressor brat regulates self-renewal in Drosophila neural stem cells. *Cell.* 124:1241-1253.
- Bettencourt-Dias, M. 2013. Q&A: Who needs a centrosome? *BMC Biology.* 11.
- Bettencourt-Dias, M., R. Giet, R. Sinka, M. Mazumdar, W.G. Lock, F. Balloux, P.J. Zafiroopoulos, S. Yamaguchi, S. Winter, R.W. Carthew, M. Cooper, D. Jones, L. Frenz, and D.M. Glover. 2004. Genome-wide survey of protein kinases required for cell cycle progression. *Nature.* 432:980-987.
- Bettencourt-Dias, M., and D.M. Glover. 2007. Centrosome biogenesis and function: centrosomics brings new understanding. *Nat Rev Mol Cell Biol.* 8:451-463.
- Bieling, P., S. Kandels-Lewis, I.A. Telley, J. van Dijk, C. Janke, and T. Surrey. 2008. CLIP-170 tracks growing microtubule ends by dynamically recognizing composite EB1/tubulin-binding sites. *J Cell Biol.* 183:1223-1233.

- Bieling, P., L. Laan, H. Schek, E.L. Munteanu, L. Sandblad, M. Dogterom, D. Brunner, and T. Surrey. 2007. Reconstitution of a microtubule plus-end tracking system in vitro. *Nature*. 450:1100-1105.
- Bitan, A., G.M. Guild, and U. Abdu. 2010. The highly elongated Drosophila mechanosensory bristle - A new model for studying polarized microtubule function. *Fly*. 4:246-248.
- Blake-Hodek, K.A., L. Cassimeris, and T.C. Huffaker. 2010. Regulation of microtubule dynamics by Bim1 and Bik1, the budding yeast members of the EB1 and CLIP-170 families of plus-end tracking proteins. *Mol Biol Cell*. 21:2013-2023.
- Blangy, A., H.A. Lane, P. d'Hérin, M. Harper, M. Kress, and E.A. Nigg. 1995. Phosphorylation by p34cdc2 Regulates Spindle Association of Human Eg5, a Kinesin-Related Motor Essential for Bipolar Spindle Formation In Vivo. *Cell*. 83:1159-1169.
- Boleti, H., E. Karsenti, and I. Vernos. 1996. Xklp2, a Novel Xenopus Centrosomal Kinesin-like Protein Required for Centrosome Separation during Mitosis. *Cell*. 84.
- Boone, J.Q., and C.Q. Doe. 2008. Identification of Drosophila type II neuroblast lineages containing transit amplifying ganglion mother cells. *Dev Neurobiol*. 68:1185-1195.
- Bouissou, A., C. Verollet, H. de Forges, L. Haren, Y. Bellaiche, F. Perez, A. Merdes, and B. Raynaud-Messina. 2014. gamma-Tubulin Ring Complexes and EB1 play antagonistic roles in microtubule dynamics and spindle positioning. *Embo J*. 33:114-128.
- Bouissou, A., C. Verollet, A. Sousa, P. Sampaio, M. Wright, C.E. Sunkel, A. Merdes, and B. Raynaud-Messina. 2009. {gamma}-Tubulin ring complexes regulate microtubule plus end dynamics. *J Cell Biol*. 187:327-334.
- Bowman, S.K., R.A. Neumuller, M. Novatchkova, Q. Du, and J.A. Knoblich. 2006. The Drosophila NuMA Homolog Mud regulates spindle orientation in asymmetric cell division. *Dev Cell*. 10:731-742.
- Bowman, S.K., V. Rolland, J. Betschinger, K.A. Kinsey, G. Emery, and J.A. Knoblich. 2008. The tumor suppressors Brat and Numb regulate transit-amplifying neuroblast lineages in Drosophila. *Dev Cell*. 14:535-546.
- Brand, A.H., and N. Perrimon. 1993. Targeted gene expression as a means of altering cell fates and generating dominant phenotypes. *Development*. 118:401-415.
- Brouhard, G.J., J.H. Stear, T.L. Noetzel, J. Al-Bassam, K. Kinoshita, S.C. Harrison, J. Howard, and A.A. Hyman. 2008. XMAP215 is a processive microtubule polymerase. *Cell*. 132:79-88.
- Bucciarelli, E., C. Pellacani, V. Naim, A. Palena, M. Gatti, and M.P. Somma. 2009. Drosophila Dgt6 interacts with Ndc80, Msps/XMAP215, and gamma-tubulin to promote kinetochore-driven MT formation. *Curr Biol*. 19:1839-1845.
- Buffin, E., D. Emre, and R.E. Karess. 2007. Flies without a spindle checkpoint. *Nat Cell Biol*. 9:565-572.
- Buffin, E., C. Lefebvre, J. Huang, M.E. Gagou, and R.E. Karess. 2005. Recruitment of Mad2 to the kinetochore requires the Rod/Zw10 complex. *Curr Biol*. 15:856-861.
- Bulinski, J.C., and A. Bossler. 1994. Purification and characterization of ensconsin, a novel microtubule stabilizing protein. *J Cell Sci*. 107:2839-2849.
- Burton, J.L., and M.J. Solomon. 2007. Mad3p, a pseudosubstrate inhibitor of APCCdc20 in the spindle assembly checkpoint. *Genes Dev*. 21:655-667.
- Cabernard, C., and C.Q. Doe. 2009. Apical/basal spindle orientation is required for neuroblast homeostasis and neuronal differentiation in Drosophila. *Dev Cell*. 17:134-141.
- Cai, S., C.B. O'Connell, A. Khodjakov, and C.E. Walczak. 2009. Chromosome congression in the absence of kinetochore fibres. *Nat Cell Biol*. 11:832-838.
- Carmena, M., X. Pinson, M. Platani, Z. Salloum, Z. Xu, A. Clark, F. Macisaac, H. Ogawa, U. Eggert, D.M. Glover, V. Archambault, and W.C. Earnshaw. 2012. The chromosomal passenger complex activates Polo kinase at centromeres. *PLoS Biol*. 10:e1001250.
- Carney, T.D., M.R. Miller, K.J. Robinson, O.A. Bayraktar, J.A. Osterhout, and C.Q. Doe. 2012. Functional genomics identifies neural stem cell sub-type expression profiles and genes regulating neuroblast homeostasis. *Dev Biol*. 361:137-146.

- Cassimeris, L. 2002. The oncoprotein 18/stathmin family of microtubule destabilizers. *Curr Opin Cell Biol.* 14:18-24.
- Castellanos, E., P. Dominguez, and C. Gonzalez. 2008. Centrosome dysfunction in Drosophila neural stem cells causes tumors that are not due to genome instability. *Curr Biol.* 18:1209-1214.
- Castoldi, M., and I. Vernos. 2006. Chromokinesin Xklp1 contributes to the regulation of microtubule density and organization during spindle assembly. *Mol Biol Cell.* 17:1451-1460.
- Caussinus, E., and C. Gonzalez. 2005. Induction of tumor growth by altered stem-cell asymmetric division in Drosophila melanogaster. *Nat Genet.* 37:1125-1129.
- Chabu, C., and C.Q. Doe. 2009. Twins/PP2A regulates aPKC to control neuroblast cell polarity and self-renewal. *Dev Biol.* 330:399-405.
- Chan, Y.W., A.A. Jeyaprakash, E.A. Nigg, and A. Santamaria. 2012. Aurora B controls kinetochore-microtubule attachments by inhibiting Ska complex-KMN network interaction. *J Cell Biol.* 196:563-571.
- Chao, W.C., K. Kulkarni, Z. Zhang, E.H. Kong, and D. Barford. 2012. Structure of the mitotic checkpoint complex. *Nature.* 484:208-213.
- Cheeseman, I.M., J.S. Chappie, E.M. Wilson-Kubalek, and A. Desai. 2006. The conserved KMN network constitutes the core microtubule-binding site of the kinetochore. *Cell.* 127:983-997.
- Cheeseman, I.M., and A. Desai. 2008. Molecular architecture of the kinetochore-microtubule interface. *Nat Rev Mol Cell Biol.* 9:33-46.
- Cheng, L., J. Zhang, S. Ahmad, L. Rozier, H. Yu, H. Deng, and Y. Mao. 2011. Aurora B regulates formin mDia3 in achieving metaphase chromosome alignment. *Dev Cell.* 20:342-352.
- Chrétien, D., F. Metoz, F. Verde, E. Karsenti, and R.H. Wade. 1992. Lattice Defects in Microtubules: Protofilament Numbers Vary Within Individual Microtubules. *J Cell Biol.* 117:1031-1040.
- Cimini, D. 2007. Detection and Correction of Merotelic Kinetochore Orientation by Aurora B and its Partners. *Cell Cycle.* 6:1558-1564.
- Cimini, D., L.A. Cameron, and E.D. Salmon. 2004. Anaphase spindle mechanics prevent mis-segregation of merotelically oriented chromosomes. *Curr Biol.* 14:2149-2155.
- Cimini, D., B.J. Howell, P. Maddox, A. Khodjakov, F. Degrossi, and E.D. Salmon. 2001. Merotelic Kinetochore Orientation Is a Major Mechanism of Aneuploidy in Mitotic Mammalian Tissue Cells. *J Cell Biol.* 153:517-527.
- Cimini, D., B. Moree, J.C. Canman, and E.D. Salmon. 2003. Merotelic kinetochore orientation occurs frequently during early mitosis in mammalian tissue cells and error correction is achieved by two different mechanisms. *J Cell Sci.* 116:4213-4225.
- Cole, D.G., W.M. Saxton, K.B. Sheehan, and J.M. Scholey. 1994. A "Slow" Homotetrameric Kinesin-related Motor Protein Purified from Drosophila Embryos. *J Biol Chem.* 269:22931-22936.
- Colombie, N., C. Verollet, P. Sampaio, A. Moisand, C. Sunkel, H.M. Bourbon, M. Wright, and B. Raynaud-Messina. 2006. The Drosophila gamma-tubulin small complex subunit Dgrip84 is required for structural and functional integrity of the spindle apparatus. *Mol Biol Cell.* 17:272-282.
- Compton, D.A. 2000. SPINDLE ASSEMBLY IN ANIMAL CELLS. *Annual Review of Biochemistry.* 69:95-114.
- Conduit, P.T., and J.W. Raff. 2010. Cnn dynamics drive centrosome size asymmetry to ensure daughter centriole retention in Drosophila neuroblasts. *Curr Biol.* 20:2187-2192.
- Cunningham, L.A., and R.A. Kahn. 2008. Cofactor D functions as a centrosomal protein and is required for the recruitment of the gamma-tubulin ring complex at centrosomes and organization of the mitotic spindle. *J Biol Chem.* 283:7155-7165.
- De Antoni, A., C.G. Pearson, D. Cimini, J.C. Canman, V. Sala, L. Nezi, M. Mapelli, L. Sironi, M. Faretta, E.D. Salmon, and A. Musacchio. 2005. The Mad1/Mad2 complex as a template for Mad2 activation in the spindle assembly checkpoint. *Curr Biol.* 15:214-225.
- Dehmelt, L., and S. Halpain. 2004. The MAP2/Tau family of microtubule-associated proteins. *Genome Biology.* 6.

- Diaz-Valencia, J.D., M.M. Morelli, M. Bailey, D. Zhang, D.J. Sharp, and J.L. Ross. 2011. Drosophila katanin-60 depolymerizes and severs at microtubule defects. *Biophys J.* 100:2440-2449.
- Dimitrov, A., M. Quesnoit, S. Moutel, I. Cantaloube, C. Poüs, and F. Perez. 2008. Detection of GTP-Tubulin Conformation in Vivo Reveals a Role for GTP Remnants in Microtubule Rescues. *Science.* 322:1353-1356.
- Dixit, R., B. Barnett, J.E. Lazarus, M. Tokito, Y.E. Goldman, and E.L. Holzbaur. 2009. Microtubule plus-end tracking by CLIP-170 requires EB1. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 106:492-497.
- Dobbelaere, J., F. Josue, S. Suijkerbuijk, B. Baum, N. Tapon, and J. Raff. 2008. A genome-wide RNAi screen to dissect centriole duplication and centrosome maturation in Drosophila. *PLoS Biol.* 6:e224.
- Domnitz, S.B., M. Wagenbach, J. Decarreau, and L. Wordeman. 2012. MCAK activity at microtubule tips regulates spindle microtubule length to promote robust kinetochore attachment. *J Cell Biol.* 197:231-237.
- Donaldson, M.M., A.A.M. Tavares, H. Ohkura, P. Deak, and D.M. Glover. 2001. Metaphase Arrest with Centromere Separation in polo Mutants of Drosophila. *J Cell Biol.* 153:663-675.
- Dumont, J. 2012. Bipolar disorder: Kinesin-12 to the rescue. *Cell Cycle.* 11:212-213.
- Egger, B., J.Q. Boone, N.R. Stevens, A.H. Brand, and C.Q. Doe. 2007. Regulation of spindle orientation and neural stem cell fate in the Drosophila optic lobe. *Neural Dev.* 2:1.
- Egger, B., K.S. Gold, and A.H. Brand. 2010. Notch regulates the switch from symmetric to asymmetric neural stem cell division in the Drosophila optic lobe. *Development.* 137:2981-2987.
- Endow, S.A., R. Chandra, D.J. Komma, A.H. Yamamoto, and E.D. Salmon. 1994. Mutants of the Drosophila ncd microtubule motor protein cause centrosomal and spindle pole defects in mitosis. *J Cell Sci.* 107:859-867.
- Espiritu, E.B., L.E. Krueger, A. Ye, and L.S. Rose. 2012. CLASPs function redundantly to regulate astral microtubules in the C. elegans embryo. *Dev Biol.* 368:242-254.
- Etienne-Manneville, S. 2010. From signaling pathways to microtubule dynamics: the key players. *Curr Opin Cell Biol.* 22:104-111.
- Faire, K., C.M. Waterman-Storer, D. Gruber, D. Masson, E.D. Salmon, and J.C. Bulinski. 1999. E-MAP-115 (ensconsin) associates dynamically with microtubules in vivo and is not a physiological modulator of microtubule dynamics. *J Cell Sci.* 112:4243-4255.
- Florian, S., and T.U. Mayer. 2011. Modulated microtubule dynamics enable Hklp2/Kif15 to assemble bipolar spindles. *Cell Cycle.* 10:3533-3544.
- Funabiki, H., and A.W. Murray. 2000. The Xenopus Chromokinesin Xkid Is Essential for Metaphase Chromosome Alignment and Must Be Degraded to Allow Anaphase Chromosome Movement. *Cell.* 102:411-424.
- Gache, V., P. Waridel, C. Winter, A. Juhem, M. Schroeder, A. Shevchenko, and A.V. Popov. 2010. Xenopus meiotic microtubule-associated interactome. *PLoS One.* 5:e9248.
- Gadde, S., and R. Heald. 2004. Mechanisms and molecules of the mitotic spindle. *Curr Biol.* 14:R797-805.
- Gadea, B.B., and J.V. Ruderman. 2006. Aurora B is required for mitotic chromatin-induced phosphorylation of Op18/Stathmin. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 103:4493-4498.
- Gaetz, J., and T.M. Kapoor. 2004. Dynein/dynactin regulate metaphase spindle length by targeting depolymerizing activities to spindle poles. *J Cell Biol.* 166:465-471.
- Gonczy, P. 2008. Mechanisms of asymmetric cell division: flies and worms pave the way. *Nat Rev Mol Cell Biol.* 9:355-366.
- Gonczy, P., S. Pichler, M. Kirkham, and A.A. Hyman. 1999. Cytoplasmic Dynein Is Required for Distinct Aspects of MTOC Positioning, Including Centrosome Separation, in the One Cell Stage Caenorhabditis elegans Embryo. *J Cell Biol.* 147:135-150.
- Goodwin, S.S., and R.D. Vale. 2010. Patronin regulates the microtubule network by protecting microtubule minus ends. *Cell.* 143:263-274.
- Goshima, G. 2011. Identification of a TPX2-like microtubule-associated protein in Drosophila. *PLoS One.* 6:e28120.

- Goshima, G., M. Mayer, N. Zhang, N. Stuurman, and R.D. Vale. 2008. Augmin: a protein complex required for centrosome-independent microtubule generation within the spindle. *J Cell Biol.* 181:421-429.
- Goshima, G., F. Nedelec, and R.D. Vale. 2005a. Mechanisms for focusing mitotic spindle poles by minus end-directed motor proteins. *J Cell Biol.* 171:229-240.
- Goshima, G., and R.D. Vale. 2003. The roles of microtubule-based motor proteins in mitosis: comprehensive RNAi analysis in the *Drosophila* S2 cell line. *J Cell Biol.* 162:1003-1016.
- Goshima, G., R. Wollman, S.S. Goodwin, N. Zhang, J.M. Scholey, R.D. Vale, and N. Stuurman. 2007. Genes required for mitotic spindle assembly in *Drosophila* S2 cells. *Science.* 316:417-421.
- Goshima, G., R. Wollman, N. Stuurman, J.M. Scholey, and R.D. Vale. 2005b. Length control of the metaphase spindle. *Curr Biol.* 15:1979-1988.
- Green, R.A., R. Wollman, and K.B. Kaplan. 2005. APC and EB1 function together in mitosis to regulate spindle dynamics and chromosome alignment. *Mol Biol Cell.* 16:4609-4622.
- Groen, A.C., T.J. Maresca, J.C. Gatlin, E.D. Salmon, and T.J. Mitchison. 2009. Functional overlap of microtubule assembly factors in chromatin-promoted spindle assembly. *Mol Biol Cell.* 20:2766-2773.
- Gruss, O.J., R.E. Carazo-Salas, C.A. Schatz, G. Guarguaglini, J. Kast, M. Wilm, N. Le Bot, I. Vernos, E. Karsenti, and I.W. Mattaj. 2001. Ran Induces Spindle Assembly by Reversing the Inhibitory Effect of Importin alpha on TPX2 Activity. *Cell.* 104:83-93.
- Gruss, O.J., M. Wittmann, H. Yokoyama, R. Pepperkok, T. Kufer, H. Sillje, E. Karsenti, I.W. Mattaj, and I. Vernos. 2002. Chromosome-induced microtubule assembly mediated by TPX2 is required for spindle formation in HeLa cells. *Nat Cell Biol.* 4:871-879.
- Gundersen, G.G., E.R. Gomes, and Y. Wen. 2004. Cortical control of microtubule stability and polarization. *Curr Opin Cell Biol.* 16:106-112.
- Gupta, K.K., C. Li, A. Duan, E.O. Alberico, O.V. Kim, M.S. Alber, and H.V. Goodson. 2013. Mechanism for the catastrophe-promoting activity of the microtubule destabilizer Op18/stathmin. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 110:20449-20454.
- Halpin, D., P. Kalab, J. Wang, K. Weis, and R. Heald. 2011. Mitotic spindle assembly around RCC1-coated beads in *Xenopus* egg extracts. *PLoS Biol.* 9:e1001225.
- Hammond, J.W., D. Cai, and K.J. Verhey. 2008. Tubulin modifications and their cellular functions. *Curr Opin Cell Biol.* 20:71-76.
- Han, J.S., A.J. Holland, D. Fachinetti, A. Kulukian, B. Cetin, and D.W. Cleveland. 2013. Catalytic assembly of the mitotic checkpoint inhibitor BubR1-Cdc20 by a Mad2-induced functional switch in Cdc20. *Mol Cell.* 51:92-104.
- Hauf, S., R.W. Cole, S. LaTerra, C. Zimmer, G. Schnapp, R. Walter, A. Heckel, J. van Meel, C.L. Rieder, and J.M. Peters. 2003. The small molecule Hesperadin reveals a role for Aurora B in correcting kinetochore-microtubule attachment and in maintaining the spindle assembly checkpoint. *J Cell Biol.* 161:281-294.
- Heald, R., R. Tournebise, T. Blank, R. Sandaltzopoulos, P. Becker, A.A. Hyman, and E. Karsenti. 1996. Self-organization of microtubules into bipolar spindles around artificial chromosomes in *Xenopus* egg extracts. *Nature.* 382:420-425.
- Heck, M.M.S., A. Pereira, P. Pesavento, Y. Yannoni, A.C. Spradling, and L.S.B. Goldstein. 1993. The Kinesin-like Protein KLP61F Is Essential for Mitosis in *Drosophila*. *J Cell Biol.* 123:665-679.
- Helmke, K.J., R. Heald, and J.D. Wilbur. 2013. Interplay between spindle architecture and function. *Int Rev Cell Mol Biol.* 306:83-125.
- Hewitt, L., A. Tighe, S. Santaguida, A.M. White, C.D. Jones, A. Musacchio, S. Green, and S.S. Taylor. 2010. Sustained Mps1 activity is required in mitosis to recruit O-Mad2 to the Mad1-C-Mad2 core complex. *J Cell Biol.* 190:25-34.
- Holy, T.E., and S. Liebler. 1994. Dynamic instability of microtubules as an efficient way to search inspace. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 91:5682-5685.
- Homem, C.C., and J.A. Knoblich. 2012. *Drosophila* neuroblasts: a model for stem cell biology. *Development.* 139:4297-4310.

- Houghtaling, B.R., G. Yang, A. Matov, G. Danuser, and T.M. Kapoor. 2009. Op18 reveals the contribution of nonkinetochore microtubules to the dynamic organization of the vertebrate meiotic spindle. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 106:15338-15343.
- Howell, B.J., B.F. McEwen, J.C. Canman, D.B. Hoffman, E.M. Farrar, C.L. Rieder, and E.D. Salmon. 2001. Cytoplasmic dynein/dynactin drives kinetochore protein transport to the spindle poles and has a role in mitotic spindle checkpoint inactivation. *J Cell Biol*. 155:1159-1172.
- Howes, S.C., G.M. Alushin, T. Shida, M.V. Nachury, and E. Nogales. 2014. Effects of tubulin acetylation and tubulin acetyltransferase binding on microtubule structure. *Mol Biol Cell*. 25:257-266.
- Hughes, J.R., A.M. Meireles, K.H. Fisher, A. Garcia, P.R. Antrobus, A. Wainman, N. Zitzmann, C. Deane, H. Ohkura, and J.G. Wakefield. 2008. A microtubule interactome: complexes with roles in cell cycle and mitosis. *PLoS Biol*. 6:e98.
- Ichihara, K., H. Kitazawa, Y. Iguchi, H. Hotani, and T.J. Itoh. 2001. Visualization of the Stop of Microtubule Depolymerization that Occurs at the High-density Region of Microtubule-associated Protein 2 (MAP2). *J Mol Biol*. 312:107-118.
- Ikeshima-Kataoka, H., J.B. Skeath, Y. Nabeshima, C.Q. Doe, and F. Matsuzaki. 1997. Miranda directs Prospero to a daughter cell during *Drosophila* asymmetric divisions. *Nature*. 390:625-629.
- Ito, K., and Y. Hotta. 1992. Proliferation Pattern of Postembryonic Neuroblasts in the Brain of *Drosophila melanogaster*. *Dev Biol*. 149:134-148.
- Izawa, D., and J. Pines. 2012. Mad2 and the APC/C compete for the same site on Cdc20 to ensure proper chromosome segregation. *J Cell Biol*. 199:27-37.
- Izumi, Y., N. Ohta, K. Hisata, T. Raabe, and F. Matsuzaki. 2006. *Drosophila* Pins-binding protein Mud regulates spindle-polarity coupling and centrosome organization. *Nat Cell Biol*. 8:586-593.
- Jakobsen, L., K. Vanselow, M. Skogs, Y. Toyoda, E. Lundberg, I. Poser, L.G. Falkenby, M. Bennetzen, J. Westendorf, E.A. Nigg, M. Uhlen, A.A. Hyman, and J.S. Andersen. 2011. Novel asymmetrically localizing components of human centrosomes identified by complementary proteomics methods. *Embo J*. 30:1520-1535.
- Janson, M.E., M.E. de Dood, and M. Dogterom. 2003. Dynamic instability of microtubules is regulated by force. *J Cell Biol*. 161:1029-1034.
- Januschke, J., and C. Gonzalez. 2010. The interphase microtubule aster is a determinant of asymmetric division orientation in *Drosophila* neuroblasts. *J Cell Biol*. 188:693-706.
- Januschke, J., S. Llamazares, J. Reina, and C. Gonzalez. 2011. *Drosophila* neuroblasts retain the daughter centrosome. *Nat Commun*. 2:243.
- Januschke, J., J. Reina, S. Llamazares, T. Bertran, F. Rossi, J. Roig, and C. Gonzalez. 2013. Centrobin controls mother-daughter centriole asymmetry in *Drosophila* neuroblasts. *Nat Cell Biol*. 15:241-248.
- Jia, L., B. Li, R.T. Warrington, X. Hao, S. Wang, and H. Yu. 2011. Defining pathways of spindle checkpoint silencing: functional redundancy between Cdc20 ubiquitination and p31(comet). *Mol Biol Cell*. 22:4227-4235.
- Jiang, K., S. Hua, R. Mohan, I. Grigoriev, K.W. Yau, Q. Liu, E.A. Katrukha, A.F. Altelaar, A.J. Heck, C.C. Hoogenraad, and A. Akhmanova. 2014. Microtubule Minus-End Stabilization by Polymerization-Driven CAMSAP Deposition. *Dev Cell*. 28:295-309.
- Jin, S., L. Pan, Z. Liu, Q. Wang, Z. Xu, and Y.Q. Zhang. 2009. *Drosophila* Tubulin-specific chaperone E functions at neuromuscular synapses and is required for microtubule network formation. *Development*. 136:1571-1581.
- Johnston, C.A., K. Hirono, K.E. Prehoda, and C.Q. Doe. 2009. Identification of an Aurora-A/PinsLINKER/Dlg spindle orientation pathway using induced cell polarity in S2 cells. *Cell*. 138:1150-1163.
- Jolly, A.L., and V.I. Gelfand. 2010. Cytoplasmic microtubule sliding - An unconventional function of conventional kinesin. *Commun Integr Biol*. 3:589-591.
- Jolly, A.L., H. Kim, D. Srinivasan, M. Lakonishok, A.G. Larson, and V.I. Gelfand. 2010. Kinesin-1 heavy chain mediates microtubule sliding to drive changes in cell shape. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 107:12151-12156.

- Kalab, P., A. Pralle, E.Y. Isacoff, R. Heald, and K. Weis. 2006. Analysis of a RanGTP-regulated gradient in mitotic somatic cells. *Nature*. 440:697-701.
- Kalab, P., R.T. Pu, and M. Dasso. 1999. The Ran GTPase regulates mitotic spindle assembly. *Current Biology*. 9:481-484.
- Kaltschmidt, J.A., C.M. Davidson, N.H. Brown, and A.H. Brand. 2000. Rotation and asymmetry of the mitotic spindle direct asymmetric cell division in the developing central nervous system. *Nat Cell Biol*. 2.
- Kapitein, L.C., E.J.G. Peterman, B.H. Kwok, J.H. Kim, T.M. Kapoor, and C.F. Schmidt. 2005. The bipolar mitotic kinesin Eg5 moves on both microtubules that it crosslinks. *Nature*. 435:114-118.
- Kapoor, T.M., T.U. Mayer, M.L. Coughlin, and T.J. Mitchison. 2000. Probing Spindle Assembly Mechanisms with Monastrol, a Small Molecule Inhibitor of the Mitotic Kinesin, Eg5. *J Cell Biol*. 150:975-988.
- Kardon, J.R., and R.D. Vale. 2009. Regulators of the cytoplasmic dynein motor. *Nat Rev Mol Cell Biol*. 10:854-865.
- Karess, R. 2005. Rod-Zw10-Zwilch: a key player in the spindle checkpoint. *Trends Cell Biol*. 15:386-392.
- Katsuki, M., D.R. Drummond, M. Osei, and R.A. Cross. 2009. Mal3 masks catastrophe events in *Schizosaccharomyces pombe* microtubules by inhibiting shrinkage and promoting rescue. *J Biol Chem*. 284:29246-29250.
- Kemphues, K.J., J.R. Priess, D.G. Morton, and N. Cheng. 1988. Identification of Genes Required for Cytoplasmic Localization in Early C, *elegans* Embryos. *Cell*. 52:311-320.
- Khodjakov, A., R.W. Cole, B.R. Oakley, and C.L. Rieder. 2000. Centrosome-independent mitotic spindle formation in vertebrates. *Current Biology*. 10:59-67.
- Khodjakov, A., L. Copenagle, M.B. Gordon, D.A. Compton, and T.M. Kapoor. 2003. Minus-end capture of preformed kinetochore fibers contributes to spindle morphogenesis. *J Cell Biol*. 160:671-683.
- Kirschner, M., and T.J. Mitchison. 1986. Beyond Self-Assembly: From Microtubules to Morphogenesis. *Cell*. 45:329-342.
- Kita, K., T. Wittmann, I.S. Nathke, and C.M. Waterman-Storer. 2006. Adenomatous polyposis coli on microtubule plus ends in cell extensions can promote microtubule net growth with or without EB1. *Mol Biol Cell*. 17:2331-2345.
- Kiyomitsu, T., C. Obuse, and M. Yanagida. 2007. Human Blinkin/AF15q14 is required for chromosome alignment and the mitotic checkpoint through direct interaction with Bub1 and BubR1. *Dev Cell*. 13:663-676.
- Kline-Smith, S.L., and C.E. Walczak. 2002. The microtubule-destabilizing kinesin XKCM1 regulates microtubule dynamic instability in cells. *Mol Biol Cell*. 13:2718-2731.
- Knoblich, J.A. 2010. Asymmetric cell division: recent developments and their implications for tumour biology. *Nat Rev Mol Cell Biol*. 11:849-860.
- Kodama, A., I. Karakesisoglou, E. Wong, A. Vaezi, and E. Fuchs. 2003. ACF7: An Essential Integrator of Microtubule Dynamics. *Cell*. 115:343-354.
- Kollman, J.M., A. Merdes, L. Mourey, and D.A. Agard. 2011. Microtubule nucleation by gamma-tubulin complexes. *Nat Rev Mol Cell Biol*. 12:709-721.
- Kollu, S., S.F. Bakhom, and D.A. Compton. 2009. Interplay of microtubule dynamics and sliding during bipolar spindle formation in mammalian cells. *Curr Biol*. 19:2108-2113.
- Komada, M., D.J. McLean, M.D. Griswold, L.D. Russell, and P. Soriano. 2000. E-MAP-115, encoding a microtubule-associated protein, is a retinoic acid-inducible gene required for spermatogenesis. *Genes Dev*. 14:1332-1342.
- Komarova, Y., C.O. De Groot, I. Grigoriev, S.M. Gouveia, E.L. Munteanu, J.M. Schober, S. Honnappa, R.M. Buey, C.C. Hoogenraad, M. Dogterom, G.G. Borisy, M.O. Steinmetz, and A. Akhmanova. 2009. Mammalian end binding proteins control persistent microtubule growth. *J Cell Biol*. 184:691-706.

- Kops, G.J., Y. Kim, B.A. Weaver, Y. Mao, I. McLeod, J.R. Yates, 3rd, M. Tagaya, and D.W. Cleveland. 2005. ZW10 links mitotic checkpoint signaling to the structural kinetochore. *J Cell Biol.* 169:49-60.
- Krahn, M.P., D. Egger-Adam, and A. Wodarz. 2009. PP2A antagonizes phosphorylation of Bazooka by PAR-1 to control apical-basal polarity in dividing embryonic neuroblasts. *Dev Cell.* 16:901-908.
- Kraut, R., W. Chia, L.Y. Jan, Y.N. Jan, and J.A. Knoblich. 1996. Role of inscuteable in orienting asymmetric cell division in *Drosophila*. *Nature.* 383:50-55.
- Kress, E., F. Schwager, R. Holtackers, J. Seiler, F. Prodon, E. Zanin, A. Eiteneuer, M. Toya, A. Sugimoto, H. Meyer, P. Meraldi, and M. Gotta. 2013. The UBXN-2/p37/p47 adaptors of CDC-48/p97 regulate mitosis by limiting the centrosomal recruitment of Aurora A. *J Cell Biol.* 201:559-575.
- Kulukian, A., J.S. Han, and D.W. Cleveland. 2009. Unattached kinetochores catalyze production of an anaphase inhibitor that requires a Mad2 template to prime Cdc20 for BubR1 binding. *Dev Cell.* 16:105-117.
- Kwon, M., S. Morales-Mulia, I. Brust-Mascher, G.C. Rogers, D.J. Sharp, and J.M. Scholey. 2004. The chromokinesin, KLP3A, drives mitotic spindle pole separation during prometaphase and anaphase and facilitates chromatid motility. *Mol Biol Cell.* 15:219-233.
- Lachkar, S., M. Lebois, M.O. Steinmetz, A. Guichet, N. Lal, P.A. Curmi, A. Sobel, and S. Ozon. 2010. *Drosophila* stathmins bind tubulin heterodimers with high and variable stoichiometries. *J Biol Chem.* 285:11667-11680.
- Lafanechere, L., and D. Job. 2000. The Third Tubulin Pool. *Neurochemical Research.* 25:11-18.
- Lampson, M.A., and I.M. Cheeseman. 2011. Sensing centromere tension: Aurora B and the regulation of kinetochore function. *Trends Cell Biol.* 21:133-140.
- Lampson, M.A., K. Renduchitala, A. Khodjakov, and T.M. Kapoor. 2004. Correcting improper chromosome-spindle attachments during cell division. *Nat Cell Biol.* 6:232-237.
- Lan, W., X. Zhang, S.L. Kline-Smith, S.E. Rosasco, G.A. Barrett-Wilt, J. Shabanowitz, D.F. Hunt, C.E. Walczak, and P.T. Stukenberg. 2004. Aurora B phosphorylates centromeric MCAK and regulates its localization and microtubule depolymerization activity. *Curr Biol.* 14:273-286.
- Lara-Gonzalez, P., F.G. Westhorpe, and S.S. Taylor. 2012. The spindle assembly checkpoint. *Curr Biol.* 22:R966-980.
- Le Bras, S., C. Rondanino, G. Kriegel-Taki, A. Dussert, and R. Le Borgne. 2012. Genetic identification of intracellular trafficking regulators involved in Notch-dependent binary cell fate acquisition following asymmetric cell division. *J Cell Sci.* 125:4886-4901.
- Lee, C.Y., R.O. Andersen, C. Cabernard, L. Manning, K.D. Tran, M.J. Lanskey, A. Bashirullah, and C.Q. Doe. 2006a. *Drosophila* Aurora-A kinase inhibits neuroblast self-renewal by regulating aPKC/Numb cortical polarity and spindle orientation. *Genes Dev.* 20:3464-3474.
- Lee, C.Y., B.D. Wilkinson, S.E. Siegrist, R.P. Wharton, and C.Q. Doe. 2006b. Brat is a Miranda cargo protein that promotes neuronal differentiation and inhibits neuroblast self-renewal. *Dev Cell.* 10:441-449.
- Lerit, D.A., and N.M. Rusan. 2013. PLP inhibits the activity of interphase centrosomes to ensure their proper segregation in stem cells. *J Cell Biol.* 202:1013-1022.
- Lesage, B., J. Qian, and M. Bollen. 2011. Spindle checkpoint silencing: PP1 tips the balance. *Curr Biol.* 21:R898-903.
- Levesque, A.A., and D.A. Compton. 2001. The chromokinesin Kid is necessary for chromosome arm orientation and oscillation, but not congression, on mitotic spindles. *J Cell Biol.* 154:1135-1146.
- Liu, D., G. Vader, M.J.M. Vromans, M.A. Lampson, and S.M.A. Lens. 2009. Sensing Chromosome Bi-Orientation by Spatial Separation of Aurora B Kinase from Kinetochore Substrates. *Science.* 323:1350-1353.

- Liu, D., M. Vleugel, C.B. Backer, T. Hori, T. Fukagawa, I.M. Cheeseman, and M.A. Lampson. 2010. Regulated targeting of protein phosphatase 1 to the outer kinetochore by KNL1 opposes Aurora B kinase. *J Cell Biol.* 188:809-820.
- London, N., and S. Biggins. 2014. Mad1 kinetochore recruitment by Mps1-mediated phosphorylation of Bub1 signals the spindle checkpoint. *Genes Dev.* 28:140-152.
- London, N., S. Ceto, J.A. Ranish, and S. Biggins. 2012. Phosphoregulation of Spc105 by Mps1 and PP1 regulates Bub1 localization to kinetochores. *Curr Biol.* 22:900-906.
- Loughlin, R., R. Heald, and F. Nedelec. 2010. A computational model predicts *Xenopus* meiotic spindle organization. *J Cell Biol.* 191:1239-1249.
- Lu, M.S., and C.A. Johnston. 2013. Molecular pathways regulating mitotic spindle orientation in animal cells. *Development.* 140:1843-1856.
- Mahoney, N.M., G. Goshima, A.D. Douglass, and R.D. Vale. 2006. Making microtubules and mitotic spindles in cells without functional centrosomes. *Curr Biol.* 16:564-569.
- Maiato, H., J. DeLuca, E.D. Salmon, and W.C. Earnshaw. 2004a. The dynamic kinetochore-microtubule interface. *J Cell Sci.* 117:5461-5477.
- Maiato, H., C.L. Rieder, and A. Khodjakov. 2004b. Kinetochore-driven formation of kinetochore fibers contributes to spindle assembly during animal mitosis. *J Cell Biol.* 167:831-840.
- Maldonado, M., and T.M. Kapoor. 2011. Constitutive Mad1 targeting to kinetochores uncouples checkpoint signalling from chromosome biorientation. *Nat Cell Biol.* 13:475-482.
- Malik, R., R. Lenobel, A. Santamaria, A. Ries, E.A. Nigg, and R. Korner. 2009. Quantitative Analysis of the Human Spindle Phosphoproteome at Distinct Mitotic Stages. *Journal of proteome research.* 8:4553-4563.
- Manna, T., S. Honnappa, M.O. Steinmetz, and L. Wilson. 2008. Suppression of Microtubule Dynamic Instability by the +TIP Protein EB1 and Its Modulation by the CAP-Gly Domain of p150Glued. *Biochemistry.* 47:779-786.
- Manning, A.L., S.F. Bakhom, S. Maffini, C. Correia-Melo, H. Maiato, and D.A. Compton. 2010. CLASP1, astrin and Kif2b form a molecular switch that regulates kinetochore-microtubule dynamics to promote mitotic progression and fidelity. *Embo J.* 29:3531-3543.
- Maresca, T.J., A.C. Groen, J.C. Gatlin, R. Ohi, T.J. Mitchison, and E.D. Salmon. 2009. Spindle assembly in the absence of a RanGTP gradient requires localized CPC activity. *Curr Biol.* 19:1210-1215.
- Marklund, U., N. Larsson, H. Melander Gradin, G. Brattsand, and M. Gullberg. 1996. Oncoprotein 18 isa phosphorylation-responsive regulator of microtubule dynamics. *Embo J.* 15:5290-5298.
- Martin-Lluesma, S., V.M. Stucke, and E.A. Nigg. 2002. Role of hied in Spindle Checkpoint Signaling and Kinetochore Recruitment of Mad1/Mad2. *Science.* 297:2267-2270.
- Masson, D., and T.E. Kries. 1993. Identification and Molecular Characterization of E-MAP-115, a Novel Microtubule-associated Protein Predominantly Expressed in Epithelial Cells. *J Cell Biol.* 123:357-371.
- Masson, D., and T.E. Kries. 1995. Binding of E-MAP-115 to Microtubules Is Regulated by Cell Cycle-dependent Phosphorylation. *J Cell Biol.* 131:1015-1024.
- Matsuzaki, F., T. Ohshiro, H. Ikeshima-Kataoka, and H. Izumi. 1998. miranda localizes staufer and prospero asymmetrically in mitotic neuroblasts and epithelial cells in early *Drosophila* embryogenesis. *Development.* 125:4089-4098.
- Mazumdar, M., S. Sundareshan, and T. Misteli. 2004. Human chromokinesin KIF4A functions in chromosome condensation and segregation. *J Cell Biol.* 166:613-620.
- McEwen, B.F., A.B. Heagle, G.O. Cassels, K.F. Buttle, and C.L. Rieder. 1997. Kinetochore Fiber Maturation in PtK1 Cells and Its Implications for the Mechanisms of Chromosome Congression and Anaphase Onset. *J Cell Biol.* 137:1567-1580.
- McNally, F.J., and S. Thomas. 1998. Katanin Is Responsible for the M-Phase Microtubule-severing Activity in *Xenopus* Eggs. *Mol Biol Cell.* 9:1847-1861.
- McNally, K.L., A.S. Fabritius, M.L. Ellefson, J.R. Flynn, J.A. Milan, and F.J. McNally. 2012. Kinesin-1 prevents capture of the oocyte meiotic spindle by the sperm aster. *Dev Cell.* 22:788-798.

- Meireles, A.M., K.H. Fisher, N. Colombie, J.G. Wakefield, and H. Ohkura. 2009. Wac: a new Augmin subunit required for chromosome alignment but not for acentrosomal microtubule assembly in female meiosis. *J Cell Biol.* 184:777-784.
- Melters, D.P., L.V. Paliulis, I.F. Korf, and S.W. Chan. 2012. Holocentric chromosomes: convergent evolution, meiotic adaptations, and genomic analysis. *Chromosome Res.* 20:579-593.
- Merdes, A., R. Heald, K. Samejima, W.C. Earnshaw, and D.W. Cleveland. 2000. Formation of Spindle Poles by Dynein/Dynactin-dependent Transport of NuMA. *J Cell Biol.* 149:851-861.
- Merdes, A., K. Ramyar, J.D. Vechio, and D.W. Cleveland. 1996. A complex of NuMA and cytoplasmic dynein is essential for mitotic spindle assembly. *Cell.* 87:447-458.
- Metzger, T., V. Gache, M. Xu, B. Cadot, E.S. Folker, B.E. Richardson, E.R. Gomes, and M.K. Baylies. 2012. MAP and kinesin-dependent nuclear positioning is required for skeletal muscle function. *Nature.* 484:120-124.
- Meunier, S., and I. Vernos. 2011. K-fibre minus ends are stabilized by a RanGTP-dependent mechanism essential for functional spindle assembly. *Nat Cell Biol.* 13:1406-1414.
- Mimori-Kiyosue, Y., I. Grigoriev, G. Lansbergen, H. Sasaki, C. Matsui, F. Severin, N. Galjart, F. Grosveld, I. Vorobjev, S. Tsukita, and A. Akhmanova. 2005. CLASP1 and CLASP2 bind to EB1 and regulate microtubule plus-end dynamics at the cell cortex. *J Cell Biol.* 168:141-153.
- Mitchison, T.J. 1993. Localization of an Exchangeable GTP Binding Site at the Plus End of Microtubules. *Science.* 261:1044-1047.
- Mitchison, T.J., and M. Kirschner. 1984. Dynamic instability of microtubule growth. *Nature.* 312.
- Miyamoto, D.T., Z.E. Perlman, K.S. Burbank, A.C. Groen, and T.J. Mitchison. 2004. The kinesin Eg5 drives poleward microtubule flux in *Xenopus laevis* egg extract spindles. *J Cell Biol.* 167:813-818.
- Morales-Mulia, S., and J.M. Scholey. 2005. Spindle pole organization in *Drosophila* S2 cells by dynein, abnormal spindle protein (Asp), and KLP10A. *Mol Biol Cell.* 16:3176-3186.
- Morin, X., and Y. Bellaiche. 2011. Mitotic spindle orientation in asymmetric and symmetric cell divisions during animal development. *Dev Cell.* 21:102-119.
- Mountain, V., C. Simerly, L. Howard, A. Ando, G. Schatten, and D.A. Compton. 1999. The Kinesin-related Protein, HSET, Opposes the Activity of Eg5 and Cross-links Microtubules in the Mammalian Mitotic Spindle. *J Cell Biol.* 147:351-365.
- Moutinho-Pereira, S., A. Debec, and H. Maiato. 2009. Microtubule cytoskeleton remodeling by acentriolar microtubule-organizing centers at the entry and exit from mitosis in *Drosophila* somatic cells. *Mol Biol Cell.* 20:2796-2808.
- Mukherjee, S., J.D. Diaz Valencia, S. Stewman, J. Metz, S. Monnier, U. Rath, A.B. Asenjo, R.A. Charafeddine, H.J. Sosa, J.L. Ross, A. Ma, and D.J. Sharp. 2012. Human Fidgetin is a microtubule severing the enzyme and minus-end depolymerase that regulates mitosis. *Cell Cycle.* 11:2359-2366.
- Muller, H., D. Schmidt, S. Steinbrink, E. Mirgorodskaya, V. Lehmann, K. Habermann, F. Dreher, N. Gustavsson, T. Kessler, H. Lehrach, R. Herwig, J. Gobom, A. Ploubidou, M. Boutros, and B.M. Lange. 2010. Proteomic and functional analysis of the mitotic *Drosophila* centrosome. *Embo J.* 29:3344-3357.
- Mummery-Widmer, J.L., M. Yamazaki, T. Stoeger, M. Novatchkova, S. Bhalerao, D. Chen, G. Dietzl, B.J. Dickson, and J.A. Knoblich. 2009. Genome-wide analysis of Notch signalling in *Drosophila* by transgenic RNAi. *Nature.* 458:987-992.
- Nachury, M.V., T.J. Maresca, W.C. Salmon, C.M. Waterman-Storer, R. Heald, and K. Weis. 2001. Importin β is a Mitotic Target of the Small GTPase Ran in Spindle Assembly. *Cell.* 104:95-106.
- Neumann, B., T. Walter, J.K. Heriche, J. Bulkescher, H. Erfle, C. Conrad, P. Rogers, I. Poser, M. Held, U. Liebel, C. Cetin, F. Sieckmann, G. Pau, R. Kabbe, A. Wunsche, V. Satagopam, M.H. Schmitz, C. Chapuis, D.W. Gerlich, R. Schneider, R. Eils, W. Huber, J.M. Peters, A.A. Hyman, R. Durbin, R. Pepperkok, and J. Ellenberg. 2010. Phenotypic profiling of the human genome by time-lapse microscopy reveals cell division genes. *Nature.* 464:721-727.

- Neumuller, R.A., C. Richter, A. Fischer, M. Novatchkova, K.G. Neumuller, and J.A. Knoblich. 2011. Genome-wide analysis of self-renewal in *Drosophila* neural stem cells by transgenic RNAi. *Cell Stem Cell*. 8:580-593.
- Nguyen, H.-L., S. Chari, D. Gruber, C.-M. Lue, J. Chapin, and J.C. Bulinski. 1997. Overexpression of full- or partial-length MAP4 stabilizes microtubules and alters cell growth. *J Cell Sci*. 110:281-294.
- Nigg, E.A. 2006. Origins and consequences of centrosome aberrations in human cancers. *Int J Cancer*. 119:2717-2723.
- Nigg, E.A., and J.W. Raff. 2009. Centrioles, centrosomes, and cilia in health and disease. *Cell*. 139:663-678.
- Noatynska, A., M. Gotta, and P. Meraldi. 2012. Mitotic spindle (DIS)orientation and DISease: cause or consequence? *J Cell Biol*. 199:1025-1035.
- Nousiainen, M., H.H. Sillje, G. Sauer, E.A. Nigg, and R. Korner. 2006. Phosphoproteome analysis of the human mitotic spindle. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 103:5391-5396.
- O'Connell, C.B., J. Loncarek, P. Kalab, and A. Khodjakov. 2009. Relative contributions of chromatin and kinetochores to mitotic spindle assembly. *J Cell Biol*. 187:43-51.
- O'Rourke, B.P., and D.J. Sharp. 2011. Microtubule Dynamics: Patronin, Protector of the Minus End. *Current Biology*. 21.
- Ogawa, H., N. Ohta, W. Moon, and F. Matsuzaki. 2009. Protein phosphatase 2A negatively regulates aPKC signaling by modulating phosphorylation of Par-6 in *Drosophila* neuroblast asymmetric divisions. *J Cell Sci*. 122:3242-3249.
- Ohi, R., K. Burbank, Q. Liu, and T.J. Mitchison. 2007. Nonredundant functions of Kinesin-13s during meiotic spindle assembly. *Curr Biol*. 17:953-959.
- Ohi, R., T. Sapra, J. Howard, and T.J. Mitchison. 2004. Differentiation of Cytoplasmic and Meiotic Spindle Assembly MCAK Functions by Aurora B-dependent Phosphorylation. *Mol Biol Cell*. 15:2895-2906.
- Peris, L., M. Thery, J. Faure, Y. Saoudi, L. Lafanechere, J.K. Chilton, P. Gordon-Weeks, N. Galjart, M. Bornens, L. Wordeman, J. Wehland, A. Andrieux, and D. Job. 2006. Tubulin tyrosination is a major factor affecting the recruitment of CAP-Gly proteins at microtubule plus ends. *J Cell Biol*. 174:839-849.
- Peris, L., M. Wagenbach, L. Lafanechere, J. Brocard, A.T. Moore, F. Kozielski, D. Job, L. Wordeman, and A. Andrieux. 2009. Motor-dependent microtubule disassembly driven by tubulin tyrosination. *J Cell Biol*. 185:1159-1166.
- Petronczki, M., and J.A. Knoblich. 2001. DmPAR-6 directs epithelial polarity and asymmetric cell division of neuroblasts in *Drosophila*. *Nat Cell Biol*. 3:43-49.
- Petry, S., A.C. Groen, K. Ishihara, T.J. Mitchison, and R.D. Vale. 2013. Branching microtubule nucleation in *Xenopus* egg extracts mediated by augmin and TPX2. *Cell*. 152:768-777.
- Petry, S., C. Pugieux, F.J. Nedelec, and R.D. Vale. 2011. Augmin promotes meiotic spindle formation and bipolarity in *Xenopus* egg extracts. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 108:14473-14478.
- Petry, S., and R.D. Vale. 2011. A new cap for kinetochore fibre minus ends. *Nat Cell Biol*. 13:1389-1391.
- Piel, M., P. Meyer, A. Khodjakov, C.L. Rieder, and M. Bornens. 2000. The Respective Contributions of the Mother and Daughter Centrioles to Centrosome Activity and Behavior in Vertebrate Cells. *J Cell Biol*. 149:317-329.
- Rahmani, Z., M.E. Gagou, C. Lefebvre, D. Emre, and R.E. Karess. 2009. Separating the spindle, checkpoint, and timer functions of BubR1. *J Cell Biol*. 187:597-605.
- Raynaud-Messina, B., and A. Merdes. 2007. Gamma-tubulin complexes and microtubule organization. *Curr Opin Cell Biol*. 19:24-30.
- Reber, S.B., J. Baumgart, P.O. Widlund, A. Pozniakovsky, J. Howard, A.A. Hyman, and F. Julicher. 2013. XMAP215 activity sets spindle length by controlling the total mass of spindle microtubules. *Nat Cell Biol*. 15:1116-1122.
- Rebollo, E., M. Roldan, and C. Gonzalez. 2009. Spindle alignment is achieved without rotation after the first cell cycle in *Drosophila* embryonic neuroblasts. *Development*. 136:3393-3397.

- Rebollo, E., P. Sampaio, J. Januschke, S. Llamazares, H. Varmark, and C. Gonzalez. 2007. Functionally unequal centrosomes drive spindle orientation in asymmetrically dividing *Drosophila* neural stem cells. *Dev Cell*. 12:467-474.
- Reboutier, D., M.B. Troadec, J.Y. Cremet, L. Chauvin, V. Guen, P. Salaun, and C. Prigent. 2013. Aurora A is involved in central spindle assembly through phosphorylation of Ser 19 in P150Glued. *J Cell Biol*. 201:65-79.
- Ribbeck, K., A.C. Groen, R. Santarella, M.T. Bohnsack, T. Raemaekers, T. Kocher, M. Gentzel, D. Gorlich, M. Wilm, G. Carmeliet, T.J. Mitchison, J. Ellenberg, A. Hoenger, and I.W. Mattaj. 2006. NuSAP, a mitotic RanGTP target that stabilizes and cross-links microtubules. *Mol Biol Cell*. 17:2646-2660.
- Rieder, C.L. 1981. The Structure of the Cold-stable Kinetochore Fiber in Metaphase PtK1 Cells. *Chromosoma*. 84:145-158.
- Robinson, J.Y., E.J. Wojcik, M.A. Sanders, M. McGrail, and T.S. Hays. 1999. Cytoplasmic Dynein Is Required for the Nuclear Attachment and Migration of Centrosomes during Mitosis in *Drosophila*. *J Cell Biol*. 146:597-608.
- Roll-Mecak, A., and F.J. McNally. 2010. Microtubule-severing enzymes. *Curr Opin Cell Biol*. 22:96-103.
- Rolls, M.M., R. Albertson, H.P. Shih, C.Y. Lee, and C.Q. Doe. 2003. *Drosophila* aPKC regulates cell polarity and cell proliferation in neuroblasts and epithelia. *J Cell Biol*. 163:1089-1098.
- Romé, P., E. Montembault, N. Franck, A. Pascal, D.M. Glover, and R. Giet. 2010. Aurora A contributes to p150(glued) phosphorylation and function during mitosis. *J Cell Biol*. 189:651-659.
- Rome, P., C. Prigent, and R. Giet. 2010. [Centrosomes, mitotic spindle and cancer: find the odd one out!]. *Medecine sciences : M/S*. 26:377-383.
- Rusan, N.M., and M. Peifer. 2007. A role for a novel centrosome cycle in asymmetric cell division. *J Cell Biol*. 177:13-20.
- Samora, C.P., B. Mogessie, L. Conway, J.L. Ross, A. Straube, and A.D. McAinsh. 2011. MAP4 and CLASP1 operate as a safety mechanism to maintain a stable spindle position in mitosis. *Nat Cell Biol*. 13:1040-1050.
- Santarella, R.A., M.D. Koffa, P. Tittmann, H. Gross, and A. Hoenger. 2007. HURP wraps microtubule ends with an additional tubulin sheet that has a novel conformation of tubulin. *J Mol Biol*. 365:1587-1595.
- Sauer, G., R. Korner, A. Hanisch, A. Ries, E.A. Nigg, and H.H. Sillje. 2005. Proteome analysis of the human mitotic spindle. *Mol Cell Proteomics*. 4:35-43.
- Saurin, A.T., M.S. van der Waal, R.H. Medema, S.M. Lens, and G.J. Kops. 2011. Aurora B potentiates Mps1 activation to ensure rapid checkpoint establishment at the onset of mitosis. *Nat Commun*. 2:316.
- Savoian, M.S., and D.M. Glover. 2010. *Drosophila* Klp67A binds prophase kinetochores to subsequently regulate congression and spindle length. *J Cell Sci*. 123:767-776.
- Saxton, W.M., J. Hicks, L.S.B. Goldstein, and E.C. Raff. 1991. Kinesin Heavy Chain Is Essential for Viability and Neuromuscular Functions in *Drosophila*, but Mutants Show No Defects in Mitosis. *Cell*. 64:1093-1102.
- Schaefer, M., M. Petronczki, D. Dorner, M. Forte, and J.A. Knoblich. 2001. Heterotrimeric G Proteins Direct Two Modes of Asymmetric Cell Division in the *Drosophila* Nervous System. *Cell*. 107:183-194.
- Schaefer, M., A. Shevchenko, A. Shevchenko, and J.A. Knoblich. 2000. A protein complex containing Inscuteable and the G α -binding protein Pins orients asymmetric cell divisions in *Drosophila*. *Current Biology*. 10:353-362.
- Schatz, C.A., R. Santarella, A. Hoenger, E. Karsenti, I.W. Mattaj, O.J. Gruss, and R.E. Carazo-Salas. 2003. Importin —alpha-regulated nucleation of microtubules by TPX2. *Embo J*. 22:2060-2070.

- Schmidt, J.C., T. Kiyomitsu, T. Hori, C.B. Backer, T. Fukagawa, and I.M. Cheeseman. 2010. Aurora B kinase controls the targeting of the Astrin-SKAP complex to bioriented kinetochores. *J Cell Biol.* 191:269-280.
- Schneider, M., W. Lu, S. Neumann, A. Brachner, J. Gotzmann, A.A. Noegel, and I. Karakesisoglou. 2011. Molecular mechanisms of centrosome and cytoskeleton anchorage at the nuclear envelope. *Cell Mol Life Sci.* 68:1593-1610.
- Schober, M., M. Schaefer, and J.A. Knoblich. 1999. Bazooka recruits Inscuteable to orient asymmetric cell divisions in *Drosophila* neuroblasts. *Nature.* 402:548-551.
- Segbert, C., R. Barkus, J. Powers, S. Strome, W.M. Saxton, and O. Bossinger. 2003. KLP-18, a Klp2 kinesin, is required for assembly of acentrosomal meiotic spindles in *Caenorhabditis elegans*. *Mol Biol Cell.* 14:4458-4469.
- Sharp, D.J., H.M. Brown, M. Kwon, G.C. Rogers, G. Holland, and J.M. Scholey. 2000. Functional Coordination of Three Mitotic Motors in *Drosophila* Embryos. *Mol Biol Cell.* 11.
- Sharp, D.J., K.L. McDonald, H.M. Brown, H.J. Matthies, C.E. Walczak, R.D. Vale, T.J. Mitchison, and J.M. Scholey. 1999a. The Bipolar Kinesin, KLP61F, Cross-links Microtubules within Interpolar Microtubule Bundles of *Drosophila* Embryonic Mitotic Spindles. *J Cell Biol.* 144:125-138.
- Sharp, D.J., K.R. Yu, J.C. Sisson, W. Sullivan, and J.M. Scholey. 1999b. Antagonistic microtubule-sliding motors position mitotic centrosomes in *Drosophila* early embryos. *Nat Cell Biol.* 1:51-54.
- Shepherd, L.A., J.C. Meadows, A.M. Sochaj, T.C. Lancaster, J. Zou, G.J. Buttrick, J. Rappsilber, K.G. Hardwick, and J.B. Millar. 2012. Phosphodependent recruitment of Bub1 and Bub3 to Spc7/KNL1 by Mph1 kinase maintains the spindle checkpoint. *Curr Biol.* 22:891-899.
- Siegrist, S.E., and C.Q. Doe. 2005. Microtubule-induced Pins/Galphai cortical polarity in *Drosophila* neuroblasts. *Cell.* 123:1323-1335.
- Siller, K.H., C. Cabernard, and C.Q. Doe. 2006. The NuMA-related Mud protein binds Pins and regulates spindle orientation in *Drosophila* neuroblasts. *Nat Cell Biol.* 8:594-600.
- Siller, K.H., and C.Q. Doe. 2008. Lis1/dynactin regulates metaphase spindle orientation in *Drosophila* neuroblasts. *Dev Biol.* 319:1-9.
- Siller, K.H., M. Serr, R. Steward, T.S. Hays, and C.Q. Doe. 2005. Live imaging of *Drosophila* brain neuroblasts reveals a role for Lis1/dynactin in spindle assembly and mitotic checkpoint control. *Mol Biol Cell.* 16:5127-5140.
- Sillje, H.H., S. Nagel, R. Korner, and E.A. Nigg. 2006. HURP is a Ran-importin beta-regulated protein that stabilizes kinetochore microtubules in the vicinity of chromosomes. *Curr Biol.* 16:731-742.
- Smith, C.A., K.M. Lau, Z. Rahmani, S.E. Dho, G. Brothers, Y.M. She, D.M. Berry, E. Bonneil, P. Thibault, F. Schweisguth, R. Le Borgne, and C.J. McGlade. 2007. aPKC-mediated phosphorylation regulates asymmetric membrane localization of the cell fate determinant Numb. *Embo J.* 26:468-480.
- Song, L., and M. Rape. 2010. Regulated degradation of spindle assembly factors by the anaphase-promoting complex. *Mol Cell.* 38:369-382.
- Song, Y., and B. Lu. 2011. Regulation of cell growth by Notch signaling and its differential requirement in normal vs. tumor-forming stem cells in *Drosophila*. *Genes Dev.* 25:2644-2658.
- Splinter, D., M.E. Tanenbaum, A. Lindqvist, D. Jaarsma, A. Flotho, K.L. Yu, I. Grigoriev, D. Engelsma, E.D. Haasdijk, N. Keijzer, J. Demmers, M. Fornerod, F. Melchior, C.C. Hoogenraad, R.H. Medema, and A. Akhmanova. 2010. Bicaudal D2, dynein, and kinesin-1 associate with nuclear pore complexes and regulate centrosome and nuclear positioning during mitotic entry. *PLoS Biol.* 8:e1000350.
- Steinmetz, M.O. 2007. Structure and thermodynamics of the tubulin-stathmin interaction. *J Struct Biol.* 158:137-147.
- Steinmetz, M.O., and A. Akhmanova. 2008. Capturing protein tails by CAP-Gly domains. *Trends Biochem Sci.* 33:535-545.

- Stumpff, J., G. von Dassow, M. Wagenbach, C. Asbury, and L. Wordeman. 2008. The kinesin-8 motor Kif18A suppresses kinetochore movements to control mitotic chromosome alignment. *Dev Cell*. 14:252-262.
- Sun, X., X. Shi, M. Liu, D. Li, L. Zhang, X. Liu, and J. Zhou. 2011. Mdp3 is a novel microtubule-binding protein that regulates microtubule assembly and stability. *Cell Cycle*. 10:3929-3937.
- Sung, H.H., I.A. Telley, P. Papadaki, A. Ephrussi, T. Surrey, and P. Rorth. 2008. Drosophila ensconsin promotes productive recruitment of Kinesin-1 to microtubules. *Dev Cell*. 15:866-876.
- Suzuki, A., and S. Ohno. 2006. The PAR-aPKC system: lessons in polarity. *J Cell Sci*. 119:979-987.
- Takemura, R., S. Okabe, T. Umeyama, and N. Hirokawa. 1995. Polarity Orientation and Assembly Process of Microtubule Bundles in Nocodazole-treated, MAP2c- transfected COS Cells. *Mol Biol Cell*. 6:981-996.
- Tanenbaum, M.E., A. Akhmanova, and R.H. Medema. 2011. Bi-Directional transport of the nucleus by dynein and kinesin-1. *Commun Integr Biol*. 4:21-25.
- Tanenbaum, M.E., L. Macurek, N. Galjart, and R.H. Medema. 2008. Dynein, Lis1 and CLIP-170 counteract Eg5-dependent centrosome separation during bipolar spindle assembly. *Embo J*. 27:3235-3245.
- Tanenbaum, M.E., L. Macurek, A. Janssen, E.F. Geers, M. Alvarez-Fernandez, and R.H. Medema. 2009. Kif15 cooperates with eg5 to promote bipolar spindle assembly. *Curr Biol*. 19:1703-1711.
- Tanenbaum, M.E., and R.H. Medema. 2010. Mechanisms of centrosome separation and bipolar spindle assembly. *Dev Cell*. 19:797-806.
- Tang, N., and W.F. Marshall. 2012. Centrosome positioning in vertebrate development. *J Cell Sci*. 125:4951-4961.
- Taylor, S.S., E. Ha, and F. McKeon. 1998. The Human Homologue of Bub3 Is Required for Kinetochore Localization of Bub1 and a Mad3/Bub1-related Protein Kinase. *J Cell Biol*. 142:1-11.
- Teixido-Travesa, N., J. Roig, and J. Luders. 2012. The where, when and how of microtubule nucleation - one ring to rule them all. *J Cell Sci*. 125:4445-4456.
- Tirnauer, J.S., S. Grego, E.D. Salmon, and T.J. Mitchison. 2002. EB1-microtubule interactions in Xenopus egg extracts: role of EB1 in microtubule stabilization and mechanisms of targeting to microtubules. *Mol Biol Cell*. 13:3614-3626.
- Tokai-Nishizumi, N., M. Ohsugi, E. Suzuki, and T. Yamamoto. 2005. The chromokinesin Kid is required for maintenance of proper metaphase spindle size. *Mol Biol Cell*. 16:5455-5463.
- Torosantucci, L., M. De Luca, G. Guarguaglini, P. Lavia, and F. Degrossi. 2008. Localized RanGTP accumulation promotes microtubule nucleation at kinetochores in somatic mammalian cells. *Mol Biol Cell*. 19:1873-1882.
- Torres, J.Z., M.K. Summers, D. Peterson, M.J. Brauer, J. Lee, S. Senese, A.A. Gholkar, Y.C. Lo, X. Lei, K. Jung, D.C. Anderson, D.P. Davis, L. Belmont, and P.K. Jackson. 2011. The STARD9/Kif16a kinesin associates with mitotic microtubules and regulates spindle pole assembly. *Cell*. 147:1309-1323.
- Tournebise, R., A. Popov, K. Kinoshita, A.J. Ashford, S. Rybin, A. Pozniakovskiy, T.U. Mayer, C.E. Walczak, E. Karsenti, and A.A. Hyman. 2000. Control of microtubule dynamics by the antagonistic activities of XMAP215 and XKCM1 in Xenopus egg extracts. *Nat Cell Biol*. 2:13-19.
- Tsukahara, T., Y. Tanno, and Y. Watanabe. 2010. Phosphorylation of the CPC by Cdk1 promotes chromosome bi-orientation. *Nature*. 467:719-723.
- Tulu, U.S., C. Fagerstrom, N.P. Ferenz, and P. Wadsworth. 2006. Molecular requirements for kinetochore-associated microtubule formation in mammalian cells. *Curr Biol*. 16:536-541.
- Uehara, R., R.S. Nozawa, A. Tomioka, S. Petry, R.D. Vale, C. Obuse, and G. Goshima. 2009. The augmin complex plays a critical role in spindle microtubule generation for mitotic progression and cytokinesis in human cells. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 106:6998-7003.
- Uteng, M., C. Hentrich, K. Miura, P. Bieling, and T. Surrey. 2008. Poleward transport of Eg5 by dynein-dynactin in Xenopus laevis egg extract spindles. *J Cell Biol*. 182:715-726.

- Valiron, O. 2011. New insights into microtubule elongation mechanisms. *Commun Integr Biol.* 4:10-13.
- Valiron, O., I. Arnal, N. Caudron, and D. Job. 2010. GDP-tubulin incorporation into growing microtubules modulates polymer stability. *J Biol Chem.* 285:17507-17513.
- van der Waal, M.S., R.C. Hengeveld, A. van der Horst, and S.M. Lens. 2012. Cell division control by the Chromosomal Passenger Complex. *Exp Cell Res.* 318:1407-1420.
- Vanneste, D., M. Takagi, N. Imamoto, and I. Vernos. 2009. The role of Hklp2 in the stabilization and maintenance of spindle bipolarity. *Curr Biol.* 19:1712-1717.
- Vernos, I., J. Raats, T. Hirano, J. Heasman, E. Karsenti, and C. Wylie. 1995. Xklpl, a Chromosomal Xenopus Kinesin-like Protein Essential for Spindle Organization and Chromosome Positioning. *Cell.* 81:117-127.
- Vérollet, C., N. Colombie, T. Daubon, H.M. Bourbon, M. Wright, and B. Raynaud-Messina. 2006. *Drosophila melanogaster* γ -TuRC is dispensable for targeting γ -tubulin to the centrosome and microtubule nucleation. *J Cell Biol.* 172:517-528.
- Vitre, B., F.M. Coquelle, C. Heichette, C. Garnier, D. Chretien, and I. Arnal. 2008. EB1 regulates microtubule dynamics and tubulin sheet closure in vitro. *Nat Cell Biol.* 10:415-421.
- Vitre, B.D., and D.W. Cleveland. 2012. Centrosomes, chromosome instability (CIN) and aneuploidy. *Curr Opin Cell Biol.* 24:809-815.
- Walczak, C.E., S. Gayek, and R. Ohi. 2013. Microtubule-depolymerizing kinesins. *Annu Rev Cell Dev Biol.* 29:417-441.
- Walczak, C.E., T.J. Mitchison, and A. Desai. 1996. XKCM1: A Xenopus Kinesin-Related Protein That Regulates Microtubule Dynamics during Mitotic Spindle Assembly. *Cell.* 84:37-47.
- Walczak, C.E., and S.L. Shaw. 2010. A MAP for bundling microtubules. *Cell.* 142:364-367.
- Walczak, C.E., I. Vernos, T.J. Mitchison, E. Karsenti, and R. Heald. 1998. A model for the proposed roles of different microtubule-based motor proteins in establishing spindle bipolarity. *Current Biology.* 8:903-913.
- Wang, C., K.C. Chang, G.W. Somers, D. Virshup, B.T. Ang, C. Tang, F. Yu, and H. Wang. 2009. Protein phosphatase 2A regulates self-renewal of *Drosophila* neural stem cells. *Development.* 136:2287-2296.
- Wang, F., J. Dai, J.R. Daum, E. Niedzialkowska, B. Banerjee, P.T. Stukenberg, G.J. Gorbsky, and J.M. Higgins. 2010. Histone H3 Thr-3 phosphorylation by Haspin positions Aurora B at centromeres in mitosis. *Science.* 330:231-235.
- Wang, H., Y. Ouyang, W.G. Somers, W. Chia, and B. Lu. 2007. Polo inhibits progenitor self-renewal and regulates Numb asymmetry by phosphorylating Pon. *Nature.* 449:96-100.
- Wang, H., G.W. Somers, A. Bashirullah, U. Heberlein, F. Yu, and W. Chia. 2006. Aurora-A acts as a tumor suppressor and regulates self-renewal of *Drosophila* neuroblasts. *Genes Dev.* 20:3453-3463.
- Wang, H.W., and E. Nogales. 2005. Nucleotide-dependent bending flexibility of tubulin regulates microtubule assembly. *Nature.* 435:911-915.
- Welburn, J.P., M. Vleugel, D. Liu, J.R. Yates, 3rd, M.A. Lampson, T. Fukagawa, and I.M. Cheeseman. 2010. Aurora B phosphorylates spatially distinct targets to differentially regulate the kinetochore-microtubule interface. *Mol Cell.* 38:383-392.
- Wen, Y., C.H. Eng, J. Schmoranzler, N. Cabrera-Poch, E.J. Morris, M. Chen, B.J. Wallar, A.S. Alberts, and G.G. Gundersen. 2004. EB1 and APC bind to mDia to stabilize microtubules downstream of Rho and promote cell migration. *Nat Cell Biol.* 6:820-830.
- Weng, M., K.L. Golden, and C.Y. Lee. 2010. dFzef/Earmuff maintains the restricted developmental potential of intermediate neural progenitors in *Drosophila*. *Dev Cell.* 18:126-135.
- Westhorpe, F.G., A. Tighe, P. Lara-Gonzalez, and S.S. Taylor. 2011. p31comet-mediated extraction of Mad2 from the MCC promotes efficient mitotic exit. *J Cell Sci.* 124:3905-3916.
- Wiese, C. 2001. Role of Importin-beta in Coupling Ran to Downstream Targets in Microtubule Assembly. *Science.* 291:653-656.

- Wirtz-Peitz, F., T. Nishimura, and J.A. Knoblich. 2008. Linking cell cycle to asymmetric division: Aurora-A phosphorylates the Par complex to regulate Numb localization. *Cell*. 135:161-173.
- Wittmann, T., M. Wilm, E. Karsenti, and I. Vernos. 2000. TPX2, A Novel Xenopus MAP Involved in Spindle Pole Organization. *J Cell Biol*. 149:1405-1418.
- Wloga, D., and J. Gaertig. 2010. Post-translational modifications of microtubules. *J Cell Sci*. 123:3447-3455.
- Wodarz, A., A. Ramrath, U. Kuchinke, and E. Knust. 1999. Bazooka provides an apical cue for Inscuteable localization in Drosophila neuroblasts. *Nature*. 402:544-547.
- Wollman, R., E.N. Cytrynbaum, J.T. Jones, T. Meyer, J.M. Scholey, and A. Mogilner. 2005. Efficient chromosome capture requires a bias in the 'search-and-capture' process during mitotic-spindle assembly. *Curr Biol*. 15:828-832.
- Yadlapalli, S., and Y.M. Yamashita. 2013. Chromosome-specific nonrandom sister chromatid segregation during stem-cell division. *Nature*. 498:251-254.
- Yamanaka, T., Y. Horikoshi, Y. Sugiyama, C. Ishiyama, A. Suzuki, T. Hirose, A. Iwamatsu, A. Shinohara, and S. Ohno. 2003. Mammalian Lgl Forms a Protein Complex with PAR-6 and aPKC Independently of PAR-3 to Regulate Epithelial Cell Polarity. *Current Biology*. 13:734-743.
- Yamashita, Y.M. 2013. Nonrandom sister chromatid segregation of sex chromosomes in Drosophila male germline stem cells. *Chromosome Res*. 21:243-254.
- Yamashita, Y.M., A.P. Mahowald, J.R. Perlin, and M.T. Fuller. 2007. Asymmetric inheritance of mother versus daughter centrosome in stem cell division. *Science*. 315:518-521.
- Yang, C.P., and S.S. Fan. 2008. Drosophila mars is required for organizing kinetochore microtubules during mitosis. *Exp Cell Res*. 314:3209-3220.
- Zhang, D., K.D. Grode, S.F. Stewman, J.D. Diaz-Valencia, E. Liebling, U. Rath, T. Riera, J.D. Currie, D.W. Buster, A.B. Asenjo, H.J. Sosa, J.L. Ross, A. Ma, S.L. Rogers, and D.J. Sharp. 2011. Drosophila katanin is a microtubule depolymerase that regulates cortical-microtubule plus-end interactions and cell migration. *Nat Cell Biol*. 13:361-370.
- Zhu, C., J. Zhao, M. Bibikova, J.D. Levenson, E. Bossy-Wetzell, J.B. Fan, R.T. Abraham, and W. Jiang. 2005. Functional analysis of human microtubule-based motor proteins, the kinesins and dyneins, in mitosis/cytokinesis using RNA interference. *Mol Biol Cell*. 16:3187-3199.
- Zhu, S., S. Barshow, J. Wildonger, L.Y. Jan, and Y.N. Jan. 2011. Ets transcription factor Pointed promotes the generation of intermediate neural progenitors in Drosophila larval brains. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 108:20615-20620.

Résumé

La mitose est une étape essentielle du cycle cellulaire à l'issue de laquelle le génome répliqué de la cellule mère est ségrégué de façon équitable entre les deux cellules filles. Pour cela, la cellule assemble une structure hautement dynamique et composée de microtubules, appelée le fuseau mitotique. En plus d'assurer la bonne ségrégation des chromosomes, le fuseau mitotique détermine l'axe de division, un phénomène particulièrement important pour la division asymétrique où des déterminants d'identité cellulaire doivent être distribués de façon inéquitable entre les deux cellules filles. L'assemblage et la dynamique de ce fuseau sont finement régulés par de nombreuses protéines qui sont associées aux microtubules.

Au cours de ma thèse, nous avons identifié 855 protéines constituant l'interactome des microtubules de l'embryon de *Drosophile* par spectrométrie de masse puis criblé par ARNi 96 gènes peu caractérisés pour un rôle en mitose dans le système nerveux central larvaire. Par cette approche, nous avons identifié 18 candidats sur la base de leur interaction aux microtubules et de leur phénotype mitotique, dont Ensconsine/MAP7. Nous avons montré qu'Ensconsine est capable de s'associer aux microtubules du fuseau et favorise leur polymérisation. De plus, les neuroblastes des larves mutantes présentent des fuseaux raccourcis et une durée de mitose prolongée. Ce délai en mitose est dû à une activation prolongée du point de contrôle du fuseau mitotique qui est essentiel pour une ségrégation correcte des chromosomes en l'absence d'Ensconsine. D'autre part, en association avec la Kinésine-1, son partenaire fonctionnel en interphase, nous avons montré qu'Ensconsine est également impliquée dans la séparation des centrosomes au cours de l'interphase. Ceci entraîne une distribution aléatoire des centrosomes pères et fils dans cellules filles.

Grâce à cette étude, nous avons révélé deux nouvelles fonctions pour Ensconsine : elle favorise la polymérisation des microtubules et participe donc à l'assemblage du fuseau mitotique et est impliquée, avec la Kinésine-1 dans la dynamique des centrosomes.

Abstract

Mitosis is a key step of the cell cycle that allows the mother cell to segregate its replicated genome equally into the two daughter cells. To do so, the cell assembles a highly dynamic structure composed of microtubules called the mitotic spindle. Additionally to its role in the faithful segregation of chromosomes, the mitotic spindle defines the axis of cell division. This phenomenon is particularly important for the asymmetric cell division in which cell fate determinants have to be unequally distributed between the two daughter cells. Spindle assembly and dynamics are subtly regulated by numerous microtubules-associated proteins.

During my PhD, we identified using mass spectrometry, 855 proteins establishing the *Drosophila* embryo microtubule interactome. An RNAi screen was performed in the larval central nervous system for 96 poorly described genes, in order to identify new mitotic regulators. Based on microtubule interaction and mitotic phenotype, among 18 candidates we focused on Ensconsin/MAP7. We have shown that Ensconsin is associated with spindle microtubules and promotes their polymerization. Neuroblasts from mutant larvae display shorter spindles and a longer mitosis duration. This mitotic delay is a consequence of an extended activation of the spindle assembly checkpoint, which is essential for the proper chromosome segregation in the absence of Ensconsin. This study also showed that, in association with its interphase partner Kinesin-1, Ensconsin is involved in centrosome separation during interphase. As a result, mother and daughter centrosomes are randomly distributed between the daughter cells.

In conclusion, we highlighted two new functions of Ensconsin : first, this protein promotes microtubule polymerization and is involved in spindle assembly ; second, Ensconsin and its partner Kinesin-1 regulate centrosome dynamics.