

UNIVERSITE PARIS-SUD, AgroParisTech, ENS CACHAN
MASTER BIOLOGIE ET SANTE
Spécialité SCIENCES DU VEGETAL
M2 Recherche

RAPPORT DE STAGE

« Exploration des Fonctions de la protéine EB1 dans les interactions microtubules - membranes »

Présenté par Arthur Molines

le 19/06/2013

Laboratoire d'accueil : Institut des Sciences du Végétal, Gif-sur-Yvette, CNRS, UPR 2355, France.

Equipe d'accueil : Dynamique de la compartimentation cellulaire

Responsable de l'équipe : Béatrice Satiat-Jeunemaître

Responsable du stage : Frédéric Coquelle

Résumé

La cellule eucaryote est organisée en compartiments endomembranaires. Ces organites intracellulaires présentent une dynamique finement régulée dans le temps et dans l'espace. Les microfilaments d'actine sont considérés comme les acteurs essentiels de cette dynamique dans la cellule végétale. Toutefois, des données éparses de la littérature suggèrent que les microtubules (MTs) pourraient aussi interagir avec les endomembranes des végétaux, mais le rôle et le mode de ces interactions sont encore largement inconnus. De plus, certaines protéines associées aux MTs possèdent une affinité pour les endomembranes, renforçant l'hypothèse d'une interaction fonctionnelle entre MTs et compartiments endomembranaires. C'est le cas de AtEB1 « *Arabidopsis thaliana* End Binding protein 1 », qui présente la propriété de se localiser à l'extrémité des MTs en croissance. Décrite d'abord chez les animaux, trois orthologues de EB1 ont été ensuite identifiés chez *A. thaliana* (AtEB1a, AtEB1b et AtEB1c). AtEB1b possède une localisation sur la membrane du réticulum endoplasmique (RE), ce qui fait de cette protéine un bon candidat pour contribuer à l'interaction entre les MTs et le RE.

Au cours de mon stage, je me suis particulièrement intéressé à AtEB1a et AtEB1b, les deux paralogues cytosoliques. L'objectif de l'étude était de donner des éléments de réponse aux questions suivantes : (1) Quel est le rôle de AtEB1a et de AtEB1b dans la régulation de la dynamique et de l'organisation du réseau cortical de MTs ? (2) A l'instar de AtEB1b, AtEB1a se localise-t-elle sur la membrane du RE ? Si oui, (3) cette +TIP joue-t-elle un rôle à l'interface MTs - RE ?

Pour atteindre cet objectif, des approches d'imagerie du vivant combinées à des analyses biochimiques ont été mises en œuvre, sur différentes lignées d'*A. thaliana* exprimant des rapporteurs des MTs.

Nous avons ainsi montré que la surexpression de AtEB1a diminue significativement la vitesse de croissance des MTs et que l'organisation du réseau microtubulaire est bouleversée chez le double mutant *eb1a-2 eb1b-3*. De plus nous avons observé une localisation de AtEB1a similaire à celle de AtEB1b et obtenu des indices d'une interaction entre RE et MTs *in vivo*.

Ces résultats permettent d'amorcer une discussion sur le rôle de AtEB1 à l'interface MT – RE, mais aussi d'apporter des informations supplémentaires à la compréhension des interactions MTs – membranes.

Summary

The eukaryotic cell is organized into membrane-covered compartments. These intracellular organelles display a tightly regulated dynamics in time and space. Actin microfilaments are considered as the major cellular actors for this activity in plant cells. However, a few scattered data in the literature suggest that microtubules (MTs) could interact with plant endomembranes, but their role and detailed binding properties are not yet known. In addition, microtubule-associated proteins have been detected on endomembranes, sustaining the hypothesis of a functional interaction between MTs and membranous organelles. Such is the case of AtEB1 “*Arabidopsis thaliana* End Binding protein 1”, which localizes to the growing MT ends. Described first in animals, three orthologs have been then discovered in *A. thaliana* (AtEB1a, AtEB1b et AtEB1c). AtEB1b binds endoplasmic-reticulum membranes, which makes AtEB1 proteins good candidates for mediating interaction between MTs and endoplasmic reticulum (ER).

I focused my work on AtEB1a and AtEB1b, the two cytosolic paralogs, to answer the following questions: (1) What are the functions of AtEB1a and AtEB1b in the regulation of MT dynamics and organization at the cellular cortex? Is AtEB1a localized to the ER membrane, such as AtEB1b? Do AtEB1a and AtEB1b play a role at the interface ER – MTs?

To answer these questions, live-cells imaging combined with biochemical analysis have been performed, using several *A. thaliana* transgenic plants expressing MTs fluorescent reporters.

We showed that AtEB1a overexpression reduces significantly the MT-growth rate and that the cortical MT network is severely impaired in double mutant *eb1a-2 eb1b-3*. Furthermore, our confocal microscopy observations revealed the same subcellular localizations for AtEB1a and AtEB1b and a few promising cues indicating dynamic interaction between MTs and ER membrane *in vivo*.

Our results allow us to comment the role of AtEB1 proteins at the interface MTs – ER, and shed further light on the understanding of MTs – endomembranes interactions.

Remerciements

En tout premier lieu, je tiens à remercier toute l'équipe d'accueil, Sébastien Bellow, Michele Bianchi Claire Boulogne, Mickael Bourge, Spencer Brown, Frédéric Coquelle, Jim Dompierre, Cynthia Dupas, Cynthia Gillet, Romain Le Bars, Rémi Le Borgne, Jessica Marion, Béatrice Satiat-Jeunemaître et Romain Santiard, pour sa convivialité et sa bonne humeur. En particulier, je remercie Béatrice Satiat-Jeunemaître pour avoir accepté ma candidature, pour m'avoir permis de réaliser ce stage et pour m'avoir promulgué tant de bons conseils, je remercie également Frédéric Coquelle pour sa disponibilité, ses anecdotes, ses compétences et surtout pour avoir retenu mon profil. Les discussions, pas toujours scientifiques, partagées avec Michele Bianchi et Romain Le Bars, ont animées mon stage tout en entraînant ma réflexion et mon esprit critique. La bonne humeur et le savoir-faire de Mickael Bourge ont été indispensables à la réalisation des expériences de cytométrie. Les incroyables compétences de Spencer Brown alliées à sa générosité m'ont été d'une grande aide tout au long de ce stage. La présence de Jim Dompierre a assuré le bon déroulement du projet, en particulier lors des expériences de microscopie et d'analyse d'image. Rien ne se serait déroulé de la même manière sans les précieux conseils donnés par Jessica Marion. Je dois à l'équipe de Sébastien Thomine (Marie-Jo Droillard) d'avoir pu mener à bien les expériences de biochimie. A celles de Jean-Denis Faure (Lionel Gissot), de Herman Höfte (Samantha Vernhettes) et de David Bouchez (Magalie Uyttewaal) l'utilisation de certaines constructions rapporteurs. Les laboratoires de Enrico Coen (Jordi Chan) et Takashi Hashimoto nous ont aidés à démarrer cette étude en nous fournissant le matériel biologique indispensable. Cette liste ne serait pas complète sans un mot pour Fathi Barrabah, Guillaume Dubeaux, Marjorie Guichard, Julie Savarin, Audrey Seigneur, Camille Verly et leur amical soutien. Pour finir je tiens à témoigner toute ma gratitude aux services communs de l'Institut des Sciences du Végétal, pour leur travail de grande qualité.

Abréviations

C-ter	<u>C</u> arboxy- <u>t</u> erminale
DBM	<u>D</u> ouble <u>M</u> utant
EB	<u>E</u> nd <u>B</u> inding protein
EBH	<u>E</u> nd <u>B</u> inding <u>H</u> omology domain
Endo-A(-GFP)	pAtEB1a::AtEB1a:GFP
Endo-B(-GFP)	pAtEB1b::AtEB1b:GFP
FRAP	<u>F</u> luorescence <u>R</u> ecovery <u>A</u> fter <u>P</u> hotobleaching
GFP	<u>G</u> reen <u>F</u> luorescent <u>P</u> rotein
MIP	<u>M</u> aximum <u>I</u> ntensity <u>P</u> rojection
MT	<u>M</u> icro <u>t</u> ubule
N-ter	<u>A</u> mino- <u>t</u> erminale
PF	<u>P</u> rotéine <u>F</u> luorescente
PS	<u>P</u> eptide <u>S</u> ignal
RE	<u>R</u> éticulum <u>E</u> ndoplasmique
SEM	<u>S</u> tandard <u>E</u> rror to the <u>M</u> ean
STED	<u>S</u> timulated <u>E</u> mission <u>D</u> epletion
TIRF	<u>T</u> otal <u>I</u> nternal <u>R</u> eflection <u>F</u> luorescence
WB	<u>W</u> estern <u>B</u> lot
+TIP	+ end <u>T</u> racking <u>P</u> rotein
35S-A(-GFP)	35S::AtEB1a:GFP
35S-A(-mCherry)	35S::AtEB1a:mCherry

Table des Matières

Table des matières -----	1
Introduction -----	2
• Le microtubule : une structure subcellulaire ubiquitaire, mais une organisation et des fonctions spécifiques dans la cellule végétale -----	2
• Les MTs et leurs partenaires : moteurs moléculaires, MAPs et +TIPs -----	4
• Les protéines EB1 dans les cellules végétales -----	6
• Objectifs du stage -----	7
Matériel et méthodes -----	8
• Matériels biologiques -----	8
• Techniques -----	9
○ Microscopie -----	9
○ Analyse d'image -----	10
○ Biochimie -----	11
Résultats -----	13
1) Estimation du niveau d'expression de AtEB1 dans les différents contextes génétiques -----	13
a. Observation de la distribution de AtEB1 par microscopie -----	13
b. Analyse quantitative des niveaux d'expression par WB -----	14
c. Analyse quantitative des niveaux d'expression par cytométrie en flux -----	14
2) Recherche des effets de la surexpression de AtEB1a sur la dynamique des MTs --	15
a. Une approche manuelle : utilisation de kymographes -----	16
b. Mise en œuvre d'une approche automatisée -----	16
3) Analyse du phénotype du double mutant <i>eb1a-2 eb1b-3</i> -----	18
a. La dynamique des microtubules chez le double mutant -----	18
b. L'organisation en faisceaux est perturbée chez le double mutant -----	19
4) Exploration des interactions AtEB1 / endomembranes -----	22
Discussion -----	24
Perspectives -----	27
Bibliographie -----	29

Introduction

Dans les cellules eucaryotes, les grandes fonctions du vivant mettent en jeu un ensemble de structures subcellulaires aujourd'hui bien identifiées telles que les compartiments endomembranaires (réticulum endoplasmique, appareil de Golgi, endosomes, vacuoles, etc) et le cytosquelette (actine, microtubules, filaments intermédiaires). Ces deux ensembles subcellulaires sont soumis à une forte dynamique spatio-temporelle : mouvements intracellulaires, réorganisation 3D au cours du cycle cellulaire ou en réponses à des contraintes biotiques ou abiotiques. L'orchestration de cette dynamique repose en grande partie sur des interactions fonctionnelles entre le cytosquelette et les membranes intracellulaires mais il reste encore de nombreuses zones d'ombre, notamment dans le cas des interactions microtubules-membranes dans la cellule végétale.

- **Le microtubule : une structure subcellulaire ubiquitaire, mais une organisation et des fonctions spécifiques dans la cellule végétale.**

Le cytosquelette se décline en trois structures, les microfilaments d'actine, les filaments intermédiaires et les microtubules (MTs). Ces trois structures, lorsqu'elles existent, sont très conservées chez les eucaryotes (animaux, plantes et champignons) (Wickstead and Gull, 2011) et dans les bactéries (Cabeen and Jacobs-Wagner, 2010). Elles sont très dynamiques, leurs composants sont renouvelés en permanence et leurs organisations changent au cours de la vie de la cellule. Le cytosquelette permet à la cellule d'acquérir et de maintenir sa forme, mais il est aussi indispensable à l'organisation et à la dynamique des compartiments intracellulaires.

Chez les eucaryotes, l'organisation 3D du cytosquelette diffère entre les animaux, les végétaux et les champignons, suggérant des modes de mise en place, de croissance et d'interactions différentes d'un règne à l'autre. Les MTs sont des objets d'études remarquables par la variabilité d'organisation qu'ils peuvent présenter. Identifiés dès les années 60 comme structures subcellulaires à part entière dans une cellule végétale (Ledbetter and Porter, 1963), la biologie des MTs est notamment étudiée depuis 50 ans dans tous les règnes vivants. De nombreuses zones d'ombres persistent quant à leurs mécanismes de régulation et d'interactions dans la cellule eucaryote. Ils semblent intervenir dans des processus communs à toutes cellules (e.g. formation du fuseau mitotique), mais sont aussi capables d'adopter des arrangements très spécifiques selon les types ou les activités cellulaires. Ainsi, dans une cellule animale, les MTs constituent le plus souvent un réseau irradiant la cellule à partir

d'une structure spécifique, le centrosome (Fig. 1-I). Dans la cellule végétale, caractérisée par la présence d'une paroi polysaccharidique, d'une vacuole, et par l'absence de centrosome, l'organisation spatiale des MT est très différente. Les études en microscopie photonique fondées sur des techniques d'immunofluorescence (Satiat-Jeunemaitre, 1989) ont notamment permis de confirmer les premières observations de Ledbetter et Porter (1963) suggérant que, dans une cellule en interphase, les MTs sont principalement corticaux et parallèles entre eux (Fig. 1-II), dessinant des hélices à pas variable entourant la cellule (Fig. 1-III). Ils sont également retrouvés dans des configurations spécifiques de la cellule végétale au moment de la division cellulaire, comme la bande préprophasique et le phragmoplaste (Rasmussen et al., 2013). Ces différences d'organisations spatiales des MTs entre cellules animales et cellules végétales en interphase reflètent-elles une profonde différence de fonction entre les deux règnes ?

Figure 1

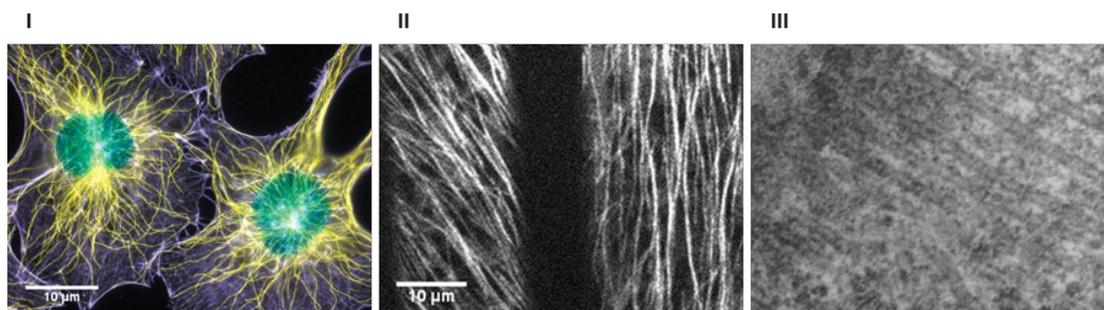


Figure 1 : Comparaison de l'organisation du réseau microtubulaire entre cellules animales et cellules végétales. (I) Fibroblastes de souris en immunofluorescence, tubuline (jaune), actine (violet) et noyau (bleu) (source : Torsten Wittman). (II) Epiderme d'hypocotyle d'*Arabidopsis thaliana* étiolée exprimant la GFP fusionnée à la tubuline- α (A. Molines). (III) Section de racine de Pleum, en microscopie électronique (x 128 000). Les microtubules apparaissent parallèles entre eux et à la périphérie de la cellule. (Ledbetter and Porter, 1963).

Une revue de la littérature tend à le démontrer. Dans les cellules animales, les MTs jouent un rôle essentiel dans la morphogenèse et la motilité cellulaire (Hall and Nobes, 2000). Ils constituent notamment un support pour le mouvement des vésicules de transport à travers la cellule, et contribuent à maintenir une organisation spatio-temporelle des compartiments endomembranaires (Fig. 1). Chez les plantes, encadrées par leur paroi, les cellules ne sont pas motiles. Le cytosquelette ne joue donc pas son rôle d'acteur essentiel de la motilité cellulaire. Les MTs ne semblent pas non plus intervenir dans les mouvements des vésicules de sécrétion entre compartiments endomembranaires ou jusqu'à la surface cellulaire. Ce rôle semble plutôt être le fait de filaments d'actine (Brandizzi and Wasteneys, 2013). En revanche, le « syndrome » MTs / microfibrilles de cellulose décrit dans la littérature évoque l'action

directe des MTs sur la paroi (Newcomb and Bonnett, 1965). Ces différences d'organisation et de fonctions sont d'autant plus intrigantes que la structure même du MT semble relativement bien conservée chez tous les eucaryotes. Les spécificités des MTs peuvent alors être liées à leurs interactions avec d'autres constituants subcellulaires. La caractérisation de protéines associées aux MTs renforce cette hypothèse.

- **Les MTs et leurs partenaires : moteurs moléculaires, MAPs et +TIPs**

Les MTs, sont formés par une dizaine de protofilaments qui interagissent latéralement pour former un tube creux de 25 nm de diamètre environ (Fig. 2-I) (Desai and Mitchison, 1997). Chaque protofilament est composé d'hétérodimères de tubulines α et β . Le MT est une structure polarisée avec une extrémité (+) exposant la tubuline- β , et une extrémité (-) exposant la tubuline- α (Fig. 2-I). Les extrémités (-) sont souvent associées aux structures de nucléation des MTs. Chez les cellules animales, comme nous l'avons dit, il s'agit du centrosome qui permet aux extrémités (+) de se déployer dans le volume cellulaire. Chez les plantes, la nucléation a lieu sur des MTs déjà existants ou au niveau de la membrane plasmique, mais les mécanismes et les éléments impliqués ne sont pas complètement élucidés (Fishel and Dixit, 2013). Les MTs présentent la particularité d'enchaîner de façon stochastique des phases de polymérisation et de dépolymérisation *in vitro* et *in vivo*. Ce comportement est appelé : instabilité dynamique (Fig. 2-II). L'instabilité dynamique est caractérisée par 4 paramètres : les vitesses de polymérisation et de dépolymérisation et les fréquences de catastrophe et de sauvetage. Les catastrophes sont les événements au cours desquels un MT passe brusquement d'une phase de polymérisation à une phase de dépolymérisation. Les sauvetages sont les événements inverses. L'instabilité est certes une propriété intrinsèque des MTs, mais elle est finement régulée *in vivo* par une myriade de facteurs. Ces facteurs jouent ainsi un rôle critique dans l'organisation et la dynamique intracellulaire (Morrison, 2007; Akhmanova and Steinmetz, 2008, 2010). Parmi ces facteurs, on trouve des moteurs moléculaires (les kinésines et les dynéines cytoplasmiques) et deux familles protéiques foisonnantes, les « Microtubule Associated Proteins » (MAPs) et les « + End-Tracking proteins » (+TIPs).

Les moteurs moléculaires sont, dans la cellule animale, indispensables à la dynamique des compartiments intracellulaires. Par exemple, chez les animaux, en l'absence de dynéine cytoplasmique, l'organisation de l'appareil de Golgi est profondément modifiée (Fig. 3-I) (Harada et al., 1998). **Les MAPs** sont capables de réguler dans le temps et dans l'espace l'assemblage des MTs en interagissant avec leur corps. **Les +TIPs** sont définies

comme des protéines qui se localisent préférentiellement à l'extrémité (+) des MTs en croissance (Schuyler and Pellman, 2001), aussi bien dans les cellules animales que végétales. Elles font le lien entre l'extrémité (+) des MTs et certaines structures sub-cellulaires comme des organites membranaires, le cortex, ou les kinétochores (Akhmanova and Steinmetz, 2008, 2010).

Dans la cellule végétale, plusieurs MAPs ont été caractérisées (Gardiner, 2013), mais c'est plus récemment que des +TIPs ont été identifiées, comme les AtEB1 et AUG8 (la sous-unité 8 de l'Augmine) (Chan et al., 2003; Mathur et al., 2003; Cao et al., 2013).

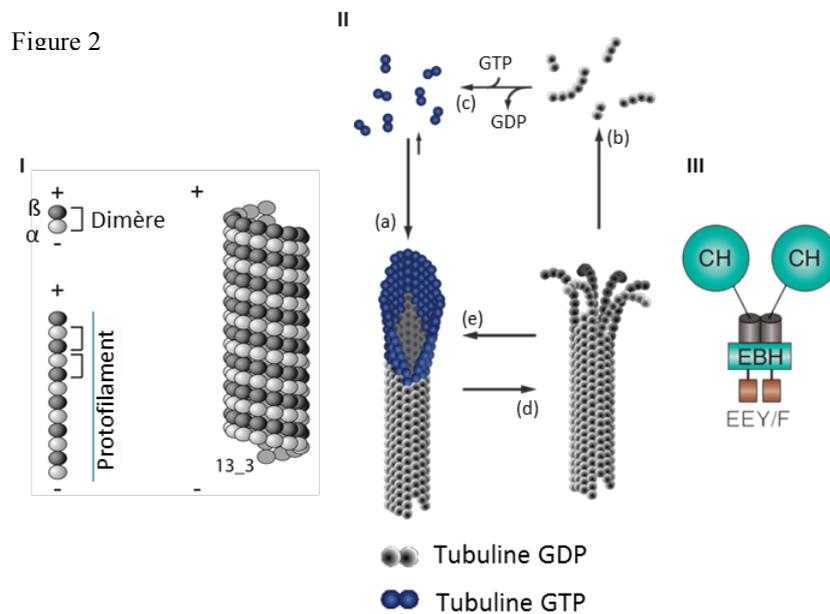


Figure 2 : Schéma de la structure d'un microtubule et de EB1. (I) Un microtubule est un tube creux formé par l'interaction latérale de protofilaments, eux même formés par un enchaînement de dimère de tubuline α et β (Coquelle *et al.*, 2009). (II) Schéma explicatif de l'instabilité dynamique à l'extrémité (+) d'un microtubule. (a) Croissance. (b) Dépolymérisation. (c) Recyclage du GDP. (d) Catastrophe, (e) Sauvetage (Desai and Mitchison, 1997). (III) Schéma de la structure de EB1 sous sa forme dimérisée. CH : « Calponin Homology », domaine de liaison aux MTs. EBH : « End-binding homology » domaine d'interaction protéine/protéine. EEY/F : motif C-terminal retrouvé chez les animaux et absent chez les végétaux (D'après Akhmanova et Steinmetz, 2010).

Dans la cellule animale, il a été montré que l'interaction des MTs avec des protéines membranaires, *via* les +TIPs, conditionne la morphogénèse de certains compartiments intracellulaires. Par exemple, la +TIP EB1 est capable, en interagissant avec la protéine STIM1, d'associer la dynamique des MTs avec des événements de morphogénèse du réticulum endoplasmique (Fig. 3-II) (Grigoriev et al., 2008). Dans la cellule végétale, les dialogues possibles entre MTs et membranes sont toutefois très pauvrement décrits, bien que plusieurs orthologues de EB1 aient été identifiés.

Figure 3

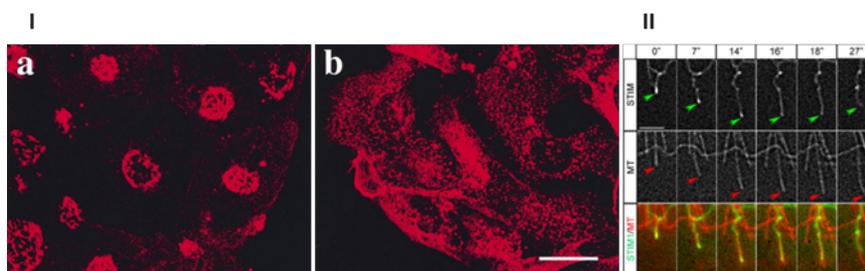


Figure 3 : Interaction MTs endomembranes (I) Désorganisation de l'appareil de Golgi (rouge) dans des blastocystes de souris cDHC $-/-$ (cytoplasmic Dynein Heavy Chain) (b) comparés au blastocystes WT (a). Marquage de l'appareil de Golgi avec du sérum anti-GM130. Barre = 10 μ m. (A.Harada *et al.*, 1998) (II) Interactin microtubules – STIM1, impliqué dans la morphogénèse de tubules du réticulum endoplasmique dans une cellule MRC5-SV. Images tirées d'un film d'une cellule MRC5-SV exprimant GFP-STIM1 et mCherry- α -tubuline en. Barre = 3 μ m. (I.Grigoriev *et al*, 2008).

- **Les protéines EB1 dans les cellules végétales**

EB1 (« end binding protein 1 ») est une des premières +TIPs identifiées chez les animaux (Su *et al.*, 1995), où elle est impliquée dans la régulation de la structure et de l'assemblage des MTs (Vitre *et al.*, 2008; Coquelle *et al.*, 2009; Maurer *et al.*, 2011). Trois orthologues ont été identifiés chez *Arabidopsis thaliana*, il s'agit de AtEb1a, AtEb1b et AtEb1c (Chan *et al.*, 2003; Mathur *et al.*, 2003). EB1 est une +TIP autonome, capable de se localiser seule à l'extrémité (+) des MTs en croissance (Bieling *et al.*, 2007), cela grâce à son domaine « Calponin Homology » (CH). Ce domaine est présent chez tous les orthologues de EB1. A l'inverse, le motif EEY/F, localisé à l'extrémité Carboxy-terminale (C-terminale) de EB1 chez les animaux et les levures, est remplacé chez *Arabidopsis* par une succession d'acides aminés acides chez AtEB1a et AtEB1b et par deux motifs basiques chez AtEB1c. Cependant toutes les AtEB1 possèdent le domaine « End Binding Homology » (EBH), caractéristique des « End Binding proteins » (EBs), qui est impliqué dans le recrutement de nombreux partenaires à l'extrémité (+) des MTs

Si la localisation de certains paralogues de AtEB1 sur les MTs a bien été décrites (Chan *et al.*, 2003; Mathur *et al.*, 2003; Dixit *et al.*, 2006; Komaki *et al.*, 2010), il n'y a cependant que très peu de données sur la fonction des AtEB1 chez les plantes. De plus une étude suggère que AtEB1b pourrait interagir directement avec la membrane du réticulum endoplasmique (Mathur *et al.*, 2003) et jouer ainsi un rôle essentiel dans des interactions fonctionnelles entre MTs et membranes. Ces données méritent cependant d'être revisitées aujourd'hui à la lumière de nouvelles approches d'imagerie permettant une meilleure résolution spatiale et temporelle.

Objectifs du stage

Comprendre la morphogenèse des compartiments endomembranaires dans la cellule végétale est le thème majeur du laboratoire. Notre hypothèse, fondée sur des données éparées de la littérature, est que les MTs pourraient avoir un rôle dans la morpho-dynamique de certains compartiments membranaires. AtEB1 nous est apparu comme le meilleur candidat pour tester cette hypothèse.

L'étude développée pendant mon stage avait pour objectif de contribuer à la compréhension du rôle de AtEB1 sur la dynamique des MTs, et de questionner aussi son rôle éventuel sur l'organisation du réseau endomembranaire. Pour essayer de répondre à ces attentes, je devais :

- étudier les rôles de AtEB1a et de AtEB1b sur la dynamique et sur l'organisation spatiale des MTs chez *Arabidopsis thaliana*

- Approfondir l'analyse des localisations subcellulaires des AtEB1 dans la cellule végétale et leur interaction éventuelle avec la membrane du réticulum endoplasmique

Pour répondre à ces objectifs, j'ai utilisé des lignées de *Arabidopsis thaliana* exprimant des protéines rapporteurs d'intérêt pour cette étude. J'ai concentré mes observations sur des cellules d'hypocotyles en croissance, car les réseaux de MTs y ont été bien décrits et le matériel se prête bien aux études d'imagerie cellulaire et moléculaire employées. Une comparaison de AtEB1-GFP exprimée sous promoteur endogène ou sous promoteur 35S m'a permis de juger de l'effet de la surexpression sur la dynamique des MTs. L'effet de ces protéines sur l'organisation des MTs a été observé par l'utilisation de lignées mutantes pour AtEB1a et AtEB1b exprimant un marqueur de tubuline.

Matériel et méthodes

Matériel biologique

Récapitulatif des différentes constructions utilisées				
Construction	Abréviation utilisé dans le rapport	Protéine suivie	Localisation	Ref / origine
35S::EB1a:GFP	35S-A(-GFP)	AtEB1a	+TIP	(Chan et al., 2003)
35S::EB1a:mCherry	35S-A(-mCherry)	AtEB1a	+TIP	(S.Verhnettes, IJPB) *
pAtEB1a::AtEB1a:GFP	Endo-A	AtEB1a	+TIP	(Komaki et al., 2010)
pEtEB1b::AtEB1b:GFP	Endo-B	AtEB1b	+TIP	(Komaki et al., 2010)
35S::GFP:TuA6	TuA6	Tubuline- α	MTs	Ueda <i>et al.</i> , 1999
35S::GFP:TuA6, eb1a-2 ; eb1b-3	DBM	Tubuline- α	MTs	(Komaki et al., 2010)
2x35S::PS:mCherry:HDEL	RE-mCherry	HDEL	RE	(Nelson et al., 2007)
2x35S::Man49:mCherry	Golgi-mCherry	Man49	Golgi	(Nelson et al., 2007)

Tableau 1 : Description des constructions rapporteurs utilisées dans cette étude. Les constructions présentes dans les lignes, les abréviations utilisées dans le texte, les protéines suivies ainsi que les localisations attendues sont décrites dans le tableau. L'astérisque indique les lignes non publiées.

Nous allons utiliser deux types de lignées *d'Arabidopsis thaliana* : d'un côté des lignées présentant un marquage des +TIPs, *via* des fusions de protéines fluorescentes (PF) à AtEB1a ou AtEB1b, en contexte sauvage ; de l'autre, des lignées exprimant la « Green Fluorescent Protein » (GFP) fusionnée à la tubuline- α en contexte double mutant ou sauvage. Dans le mutant eb1a-2, l'expression du gène At3G47690 codant la protéine AtEB1a est altérée par l'insertion d'un tDNA dans l'exon numéro 7. Dans le mutant Eb1b-3, l'expression du gène At5G62500 codant la protéine AtEB1b est annulée par la substitution de la cytosine 1147 par une thymine, ce qui crée un codon stop prématuré dans le 4^{ème} exon. La lignée eb1a-2 provient du « Arabidopsis Biological Resource Center » (n°CS858017) et a été croisée avec la lignée eb1b-3 provenant du « Seattle TILLING Project » (Till et al., 2003) par l'équipe de T. Hashimoto (Komaki et al., 2010). Le double mutant résultant de ce croisement a été à son tour croisé par l'équipe de T. Hashimoto avec la lignée 35S::GFP:TuA6 (Ueda et al., 1999) pour obtenir une lignée n'exprimant plus ni AtEB1a ni AtEB1b mais possédant une fusion GFP de la tubuline- α permettant l'observation des MTs.

Conditions de cultures des plantes pour les différentes expériences						
Expérience	Stratification	Flash	Culture	T° culture	Eclairage	Photopériode
Expressions transitoire	24h (4°C)	Non	96h + 72h	21°C	118 $\mu\text{Mol.s}^{-1}.\text{m}^{-2}$	16h
Expressions stables (TIRF)	24h (4°C)	6h (23°C)	96h	21°C	Obscurité	Non
Cytométrie	24h (4°C)	6h (23°C)	96h	21°C	Obscurité	Non
WB	24h (4°C)	6h (23°C)	96h	21°C	Obscurité	Non

Tableau 1 : Description des conditions dans lesquelles les plantes ont été cultivées.

Les agrobactéries sont cultivées dans du milieu 2YT (16 g de Bacto Tryptone, 10 g de Bacto Yeast Extract, 5 g de NaCl par litre d'eau, pH 7) à 30°C et utilisées pendant leur phase exponentielle de croissance. Pour la transformation, les cultures bactériennes sont centrifugées à 5000 g pendant 15 minutes et les culots repris dans 2 ml de 2YT. Cette solution est ensuite diluée dans du MS/2 (2,15 g de Murashige and Skoog medium, 0,59 g de MES, 5 g de sucrose, pH 5,6) additionné d'acétosyringone à 200µM pour obtenir une DO_{600nm} comprise entre 1 et 2. Les plantules sont alors recouvertes de cette solution, 2 x 45 secondes de vide sont appliquées, puis la solution est ôtée. Après cela, les plantes sont remises en chambre de culture pendant 3 jours, avant l'observation.

Les protoplastes utilisés en cytométrie ont été obtenus par digestion des plantules d'*A. thaliana* dans un cocktail enzymatique (0,5% de cellulase Onozuka RS, 0,5% de maceroenzyme R1 et 0,05% de pectolyase dans une solution de milieu MS (4,3 g de Murashige and Skoog medium, 0,59 g de MES, 5 g de sucrose, pH 5,6) à 6 mM de sorbitol) agité à 100 tours/minutes, à 26°C, à l'obscurité. Les protoplastes sont ensuite récupérés en centrifugeant à 300 g, pendant 5 minutes, le cocktail préalablement filtré (filtre de 100 µm).

Techniques

Microscopie

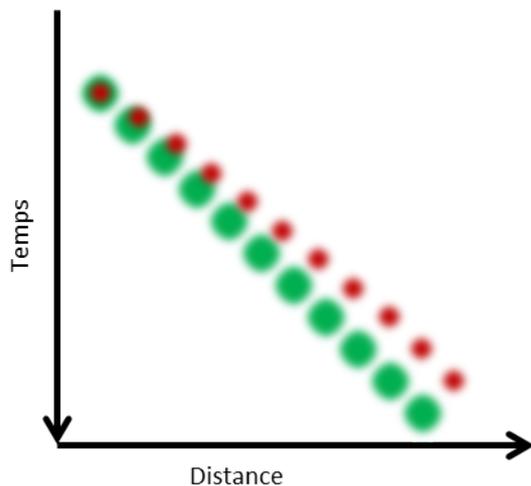
Les films utilisés pour l'étude dynamique des microtubules ont été réalisés au niveau de l'hypocotyle de plantules étiolées de 4 jours, en mode TIRF et en utilisant la technique du FRAP (« Fluorescence Recovery After Photobleaching ») avec le microscope inversé Nikon Eclipse Ti-E de la plateforme de microscopie photonique de Imagif. Ce microscope est équipé d'un bras TIRF motorisé et d'un bras FRAP. Les acquisitions ont été faites avec un objectif 100 X possédant une ouverture numérique de 1,49 et une caméra Coolsnap HQ2 possédant des pixels de 6.45 µm carré. Afin de mieux distinguer les événements de polymérisation, une région de chacune des cellules d'intérêt a été photoblanchie grâce au bras FRAP. Les plantules transformées pour exprimer transitoirement des marqueurs endomembranaires ont été observées avec le microscope confocale inversé TCS SP8 X de Leica Microsystems, avec l'objectif 63X ayant une ouverture numérique de 1,4. Les films obtenus ont été analysés avec le logiciel ImageJ.

Les protoplastes ont été analysés avec un cytomètre analyseur-trieur MoFlo Astrios de Beckman Coulter, piloté par le logiciel Summit 6.1 (plate-forme Imagif). La GFP a été excitée

par un laser de 100 W, à 488 nm, l'émission a été récoltée à travers un filtre passe-bande de 513/526 nm.

Analyse d'image

Les films acquis pour comparer les vitesses de polymérisation entre les lignées 35S::Eb1a:GFP, 35S::Eb1a:mCherry, pEb1a::Eb1a:GFP et pEb1b::Eb1b:GFP ont été analysés avec le greffon KymoToolBox du logiciel ImageJ. Ce programme permet, d'analyser le déplacement de particules dans le temps, et de connaître les vitesses moyennes de déplacement de ces particules le long de leurs trajectoires. Après avoir sélectionné manuellement les trajectoires, le greffon permet de tracer leurs kymographes. Un kymographe est une projection en fonction du temps de la position de la particule le long de sa trajectoire (schéma ci-après).



Kymographe de deux particules hypothétiques, se déplaçant le long de la même trajectoire. La particule rouge est la plus rapide.

La pente du kymographe correspond à la vitesse moyenne de la particule le long de cette trajectoire. Plusieurs trajectoires ont été analysées dans chacun des films réalisés.

Vitesses de polymérisation des microtubules chez les différentes lignées étudiées.

Génotypes	Vitesse de polymérisation moyenne	Variance	Ecart-type	Nombre de trajectoires analysées	Nombre de films analysés	Nombre de plantes utilisées
pEb1a::Eb1a:GFP	7,854849315	2,188301716	1,47929095	219	9	2
pEb1b::Eb1b:GFP	8,236298077	3,068278311	1,751650168	416	10	3
p35S::Eb1a:GFP	6,939	2,248750619	1,499583482	340	10	2
p35S::Eb1a:mCherry	6,767633588	6,05751709	2,461202367	393	13	3

Tableau 2 : données statistiques relatives aux mesures des vitesses moyennes déduites des kymographes

Analyse statistique des différences constatées, entre les différents génotypes après l'analyse par KymoToolBox.

p-value, d'après un test t de student	pEb1a::Eb1a:GFP	pEb1b::Eb1b:GFP	p35S::Eb1a:GFP	p35S::Eb1a:mCherry	eb1a-2 eb1b-3
pEb1a::Eb1a:GFP		0,004	4E-12	2E-11	
pEb1b::Eb1b:GFP	0,004		5E-06	4E-21	
p35S::Eb1a:GFP	4E-12	5E-06		0,249	
p35S::Eb1a:mCherry	2E-11	4E-21	0,249		
WT					0,414

Tableau 3 : P-value, d'après un test-t de student, entre les vitesses moyennes constatées, avec KymoToolBox dans chaque génotype. Les tests ont été effectués avec le logiciel Excel.

Les films 35S::Eb1a:GFP et pEb1a::Eb1a:GFP ont aussi été analysés avec le logiciel plusTipTracker fonctionnant dans l'environnement de Matlab (Applegate et al., 2011). Ce logiciel analyse de façon automatique les films, pour détecter les comètes, reconstruire les trajectoires et calculer la vitesse moyenne de chaque comète. Une première étape de traitement du signal, permet la détection des comètes, suite à quoi les trajectoires sont reconstruites mathématiquement. La reconstruction mathématique est fondée sur l'attribution d'un coup à chaque liaison entre comètes, ce coût dépend de la distance entre comètes, de leur alignement, etc... L'algorithme calcule la solution qui va minimiser le coût global de toutes les trajectoires, sur l'ensemble du film.

Vitesses de polymérisation moyennes obtenues après analyse par plusTipTracker.

	35S::AtEB1a:GFP	pAtEB1a::AtEB1a:GFP
Nombre de trajectoires	1663	1528
Moyenne V _{pol}	3,79489	7,01073
Ecart-type V _{pol}	2,19249	2,13322
Fréquence de catastrophe	0,109572	0,108328

Tableau 4 : vitesses moyennes déduites des trajectoires calculées par plusTipTracker

Biochimie

Le Western Blot a été réalisé sur des extraits protéiques obtenus par broyage des plantules dans l'azote liquide. Les protéines ont été extraites avec du tampon TNPI (TRIS base pH8 50mM, NaCl 150mM, PMSF 1mM et Iodoacétamide 10mM), 5µL de cette solution

étaient utilisés par milligramme de résidu obtenu. L'extrait protéique a été dénaturé par l'ajout de tampon Laemmli (Laemmli, 1970) et par chauffage à 96°C pendant 5 minutes. 20µL d'extraits ont été déposés dans chaque puits d'un gel acrylamide à 10%. Lors de la migration, l'ampérage était fixé à 15 mA. Le transfert sur membrane s'est fait dans une machine Bio-Rad Trans-Blot[®] Turbo, de transfert semi-sec, à 25V et à 1A pendant 30 minutes. La membrane a été bloquée pendant 2h dans du lait filtré (7,5 mL de poudre de lait écrémé Gloria dissoute dans du TBST). Suite à quoi, pour la détection de la GFP, la membrane a été lavée 3 fois 5 minutes au TBST (TRIS base 50 mM, NaCl 150 mM, Tween-20 0,05%), avant d'être incubée 2h30 dans l'anticorps primaire (anti-GFP de souris, JL-8 de Clontech) dilué 20 000 fois dans du lait filtré, puis rincée 3 fois 5 minutes dans du TBST avant 1h d'incubation dans l'anticorps secondaire (anti-souris de chèvre fusionné à la peroxydase, CALBIOCHEM ref#401253) dilué 10 000 fois dans du lait filtré. Pour la détection de la protéine Tudor-SN, la même membrane a été lavée, séchée, stockée 36 h à 4°C avant d'être rincée 3 fois 5 minutes au TBST, puis incubée 2 h 30 dans l'anticorps primaire (anti-Tudor-SN de lapin, Dit Frey NF *et al*, The Plant Cell, 2010) dilué 4 000 fois dans du lait filtré, de nouveau rincée 3 fois 5 minutes dans du TBST avant 1 h d'incubation dans l'anticorps secondaire (anti-lapin de chèvre fusionné à la peroxydase, CALBIOCHEM ref#401353) dilué 2 000 fois dans du lait filtré. La révélation a été faite en chambre noire, avec des films photos Thermo SCIENTIFIC ref# 34090, par 5 mL d'un mélange des réactifs MILLIPORE Immobilon[™] Western HRP substrate Luminol Reagent et HRP substrate Peroxide Solution selon le protocole fourni par le fabricant.

Résultats

Pour atteindre nos objectifs que nous nous sommes fixés, à savoir : comprendre les fonctions de AtEB1 dans la dynamique et l'organisation des microtubules ; étudier les localisations de AtEB1 et son implication à l'interface microtubules – membranes nous commencerons par estimer le niveau d'expression de AtEB1 dans les différentes lignées utilisées dans l'étude. Suite à quoi, nous corrélons le niveau d'expression de AtEB1a avec la vitesse de polymérisation des microtubules, avant d'analyser la dynamique et l'organisation des microtubules chez le double mutant *eb1a-2 eb1b-3*. Nous finirons par une exploration des localisations de AtEB1a et de la possible relation microtubules – réticulum endoplasmique.

- 1) Estimation du niveau d'expression de AtEB1 dans les différents contextes génétiques.
 - a) Observation de la distribution subcellulaire de AtEB1 par microscopie.

Les plantes exprimant AtEB1-GFP, sous contrôle soit du promoteur endogène soit du promoteur 35S, ne présentaient pas d'altérations de leur développement ou de leur morphologie par rapport aux plantules sauvages. Afin d'évaluer si les variations du niveau d'expression d'AtEB1 entre les lignées ont un impact sur l'organisation cellulaire et afin d'évaluer les différences éventuelles entre AtEB1a et AtEB1b, nous avons tout d'abord comparé la distribution de AtEB1a-GFP à celle de AtEB1b-GFP dans les cellules épidermiques de l'hypocotyle par microscopie confocale. L'épiderme est en effet un tissu facile d'accès par ce type de microscopie photonique. Quel que soit le promoteur d'expression utilisé, endogène ou 35S, le marquage fluorescent révèle des « comètes » fluorescentes dans tout le cytoplasme aussi bien pour AtEB1a que pour AtEB1b, confirmant les observations initiales de Chan J. et Mathur J. (Chan et al., 2003; Mathur et al., 2003). Ces comètes sont assimilées au marquage de l'extrémité (+) des microtubules (MTs), comme attendu pour une +TIP. En conditions endogènes, AtEB1 se localise aux extrémités (+) des MTs et demeure quasiment indétectable le long du MT (Fig. 4-I). En revanche, on constate que le marquage des +TIPs s'étend au corps des MT dans les plantes 35S (Fig.4-I). Cette différence de marquage entre les deux lignées rejoint les données structurales publiées par les groupes de C. Moores et T. Surrey (Mauer *et al.* 2012), et montre que le mode ou le degré d'association de AtEB1 sur les MTs dépend de la concentration de AtEB1 dans la cellule.

Nous avons cherché alors à avoir des données quantitatives sur les différences d'expression justifiant ces différences de localisation.

b) Analyse quantitative des niveaux d'expression par Western Blot.

Le Western Blot (WB) permet une approche semi-quantitative pour répondre à ce genre de question. En utilisant un anticorps dirigé contre la GFP, il est possible d'estimer la quantité de chimères AtEB1:GFP présentes dans les plantules. Le WB réalisé avec nos lignées de plantules exprimant AtEB1-GFP révèle une bande d'environ 60 kDa, correspondant à la masse moléculaire attendue pour une telle protéine chimérique (Fig. 4-II). Il montre de plus que la quantité de protéine est presque 4 fois plus importante dans la plante lorsque le promoteur 35S est utilisé à la place du promoteur endogène (Fig. 4-III). La quantité de protéine Tudor-SN, utilisée ici comme contrôle (dit Frey et al., 2010), ne varie pas entre les génotypes. Notons que dans ces premières expériences, la bande correspondant aux extraits provenant de plantes AtEB1-GFP sous promoteur endogène (Endo-A-GFP) est absente alors que les observations en fluorescence confirmaient l'expression de la protéine. Ceci peut être causé par : un problème lors de la révélation ; une différence de stabilité des protéines chimères lors de l'extraction ou une quantité de protéine inférieure au seuil de détection. D'autres expériences sont en cours pour compléter notre tableau et pour confirmer que les niveaux d'expression de AtEB1a et de AtEB1b sont comparables dans ce tissu.

c) Analyse quantitative des niveaux d'expression par cytométrie en flux.

Des mesures quantitatives par cytométrie en flux vont nous permettre de comparer l'intensité de fluorescence induite par les expressions de protéines rapporteurs dans les différents génotypes. Les analyses sont faites sur des protoplastes issus de plantules des différentes lignées. Bien que l'expression des protéines étudiées puisse se trouver modifiée lors de la préparation des protoplastes, nous faisons l'hypothèse que ces modifications éventuelles sont de même ampleur dans tous les génotypes. Les cytogrammes révèlent clairement la différence d'intensité de fluorescence (donc de quantité d'AtEB1-GFP) existant entre les protoplastes issus de plantes 35S et ceux issus de plantes exprimant la protéine sous contrôle des promoteurs endogènes Endo-A et Endo-B : les premières présentent une quantité de fluorescence, et donc de protéines chimères AtEB1-GFP, de 7 à 10 fois plus fortes que les secondes (Fig. 4-IV).

Ces résultats de microscopie, de biochimie et de cytométrie confirment qu'une surexpression de la protéine AtEB1a, est suffisante pour modifier les conditions d'affinité de la protéine sur les MTs. Cette propriété peut nous aider à comprendre les interactions entre

AtEB1 et MT, et entre AtEB1 et d'autres constituants subcellulaires. Ces lignées AtEB1-GFP seront donc deux outils pour explorer les effets de AtEB1 sur la dynamique des MTs.

Figure 4

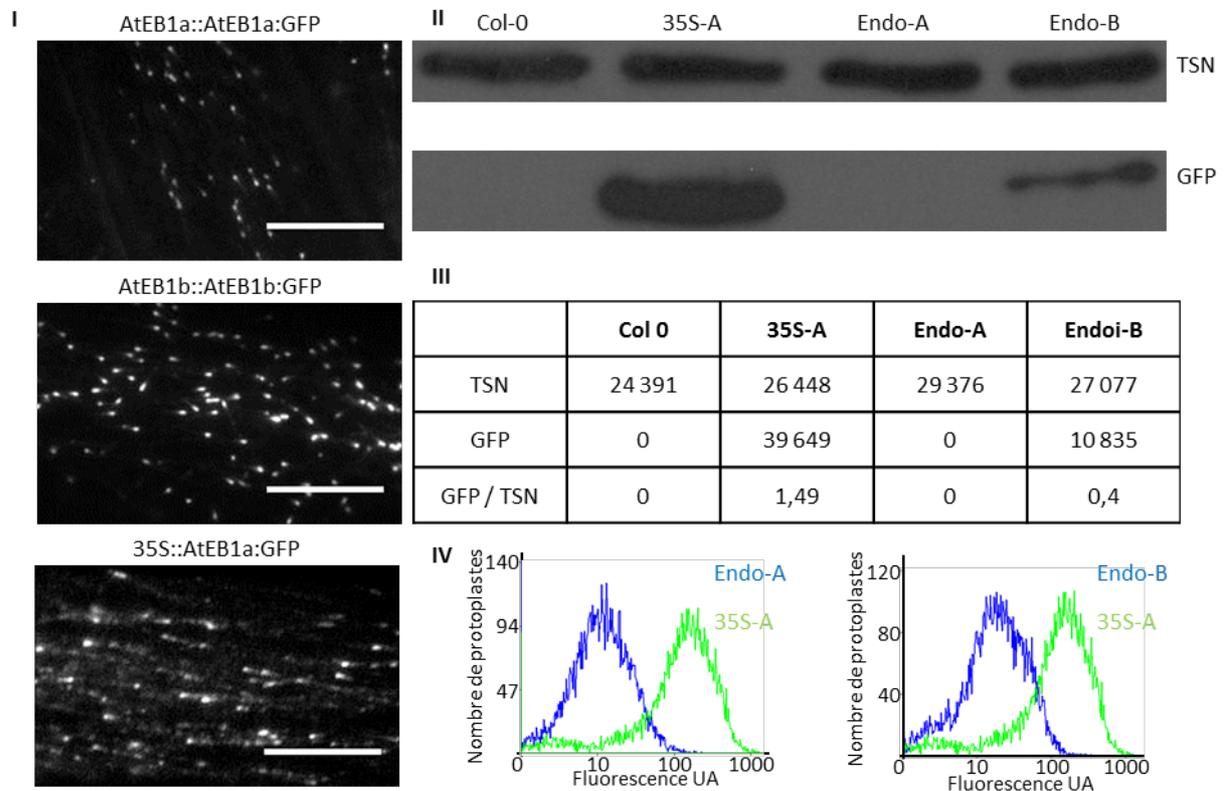


Figure 4 : Localisation et expression de AtEB1-GFP dans les cellules épidermiques de l'hypocotyle. (I) Marquage GFP associé aux différentes lignées. Noter la présence de comètes fluorescentes dispersées dans le cytoplasme pour toutes les constructions, avec un marquage étendu au corps des microtubules dans le cas de AtEB1-GFP sous contrôle du promoteur 35S. Barres = 10 μ m. (II) WB, la protéine Tudor-SN est utilisée comme contrôle de charge, la détection des chimères AtEB1-GFP se fait grâce à un anticorps dirigé contre la GFP. Mise en évidence d'une bande unique de \sim 60 kDa. (III) Quantification relative des chimères AtEB1-GFP dans les extraits 35S-A et Endo-B d'après le WB. L'expression des protéines AtEB1-GFP est 4 fois plus importante dans le cas de lignées AtEB1-GFP exprimée sous 35S. (IV) Cytogrammes indiquant la quantité de fluorescence de AtEB1-GFP dans les différentes lignées.

2) Recherche des effets de la surexpression de AtEB1a sur la dynamique des MTs.

Une fois établie la différence d'expression entre ces deux lignées, il est légitime de se demander si cela a un effet sur la dynamique des MTs. AtEB1a et AtEB1b ayant a priori le même comportement, nous concentrons notre étude sur AtEB1a.

Notre stratégie fut de photoblanchir la zone de l'hypocotyle observée, et d'observer la réapparition et le mouvement de comètes marquées par AtEB1 au cours du temps (méthodes de FRAP, « Fluorescence Recovery After Photobleaching »). Les images sont acquises en

mode TIRF (« Total Internal Reflection Fluorescence »). Ces expériences de FRAP montrent clairement que les comètes ont des mouvements rectilignes. Ces mouvements sont indicateurs des processus de polymérisation des MTs. En effet, EB1 n'est associée à l'extrémité (+) des MTs que pendant les phases de polymérisation. Cela permet de suivre la polymérisation des MTs, mais pas leur dépolymérisation ni, *a fortiori*, les fréquences de transition. Nous allons donc évaluer la vitesse de polymérisation des MTs dans nos deux contextes d'expression. Dans ce but, nous avons enregistré des séquences d'images de cellules de l'épiderme de nos hypocotyles exprimant des chimères GFP de AtEB1. Comme évoqué précédemment, l'épiderme est un tissu facile d'accès, facile à observer en microscopie et autorisant l'utilisation de la microscopie TIRF nécessaire à notre étude sur la dynamique des MTs.

a) Une approche manuelle : utilisation de kymographes

Les images ont été enregistrées sur des séquences de 5 minutes à raison d'une image toutes les 2 secondes. Elles ont été ensuite analysées avec le greffon, KymoToolBox (Fjorback et al., 2012) du logiciel ImageJ, qui permet de tracer des kymographes. Un kymographe est une projection, en fonction du temps, de la trajectoire d'un objet, ici une comète. La pente de cette trajectoire nous permet de déterminer la vitesse moyenne de l'objet depuis le point de départ de la trajectoire jusqu'à son point d'arrivée. Le nombre de trajectoires analysées permet de mettre en évidence une différence significative de vitesse de polymérisation entre les plantes exprimant AtEB1a sous le contrôle de son promoteur et celles l'exprimant sous le contrôle du promoteur 35S (Fig. 5-I et 5-II). La vitesse moyenne des comètes AtEB1-GFP exprimées sous promoteur 35S ($6,8 \mu\text{m}\cdot\text{min}^{-1}$), est en effet significativement plus basse que celle correspondant aux comètes des plantules exprimant AtEB1 sous promoteur endogène ($7,85$ et $8,24 \mu\text{m}\cdot\text{min}^{-1}$ selon le génotype).

b) Mise en œuvre d'une approche automatisée

Avec KymoToolBox, l'analyse manuelle des trajectoires et des kymographes qui en résultent peut induire un biais, puisque c'est l'expérimentateur qui choisit les trajectoires à analyser. D'autre part nous n'avons accès qu'à la vitesse de polymérisation, soit seulement un des facteurs caractérisant la dynamique des MTs. Pour dépasser les limites de ce logiciel, nous avons cherché à mettre en œuvre une approche automatisée avec le logiciel plusTipTracker (Applegate et al., 2011). Ce logiciel repose sur des techniques d'analyse d'image et de traitement des données pour améliorer la détection et le suivi des comètes. Il résout de façon mathématique les trajectoires empruntées par chacune des comètes de l'image

au cours du temps. Nous l'avons appliqué sur les films obtenus avec les plantes Endo-A et 35S-A-GFP. Les résultats confirment nos premières analyses. En effet, les cartes et histogrammes montrent que les MTs des cellules surexprimant AtEB1a ont une vitesse de polymérisation plus faible que les autres.

I Figure 5

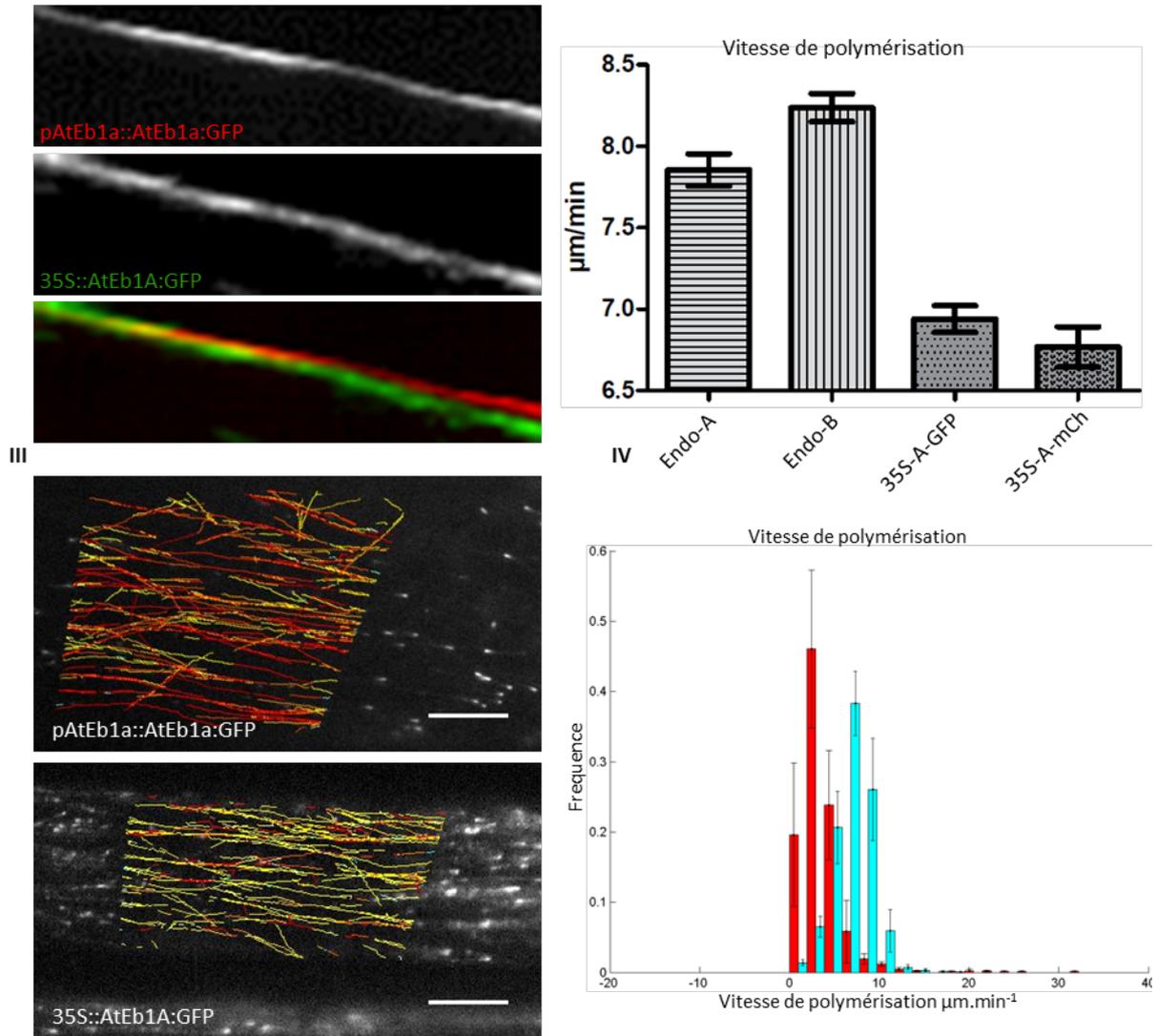


Figure 5 : Comparaison de la vitesse de croissance des MTs entre les plantes 35S et Endo AtEB1. (I) Kymographes, représentatifs des MTs observés dans les plantes 35S::AtEB1A:GFP (vert) et AtEB1a::AtEB1a:GFP (rouge), obtenus avec le greffon KymoToolBox de ImageJ (F.P. Cordelières, Institut Curie). L'axe X représente une longueur de 5,49 μm , l'axe Y un temps de 40 sec. On remarque la pente plus prononcée du kymographe correspondant à la surexpression de AtEB1-GFP. (II) Histogramme des vitesses moyennes de chaque génotype, obtenues avec les données fournies par KymoToolBox, montrant un effet prononcé de la surexpression de AtEB1 sur la croissance des MTs. (III) Carte indiquant les vitesses moyennes des trajectoires analysées par l'application plusTipTracker de MATLAB (G. Danuser, Harvard Medical School) à partir de films de plantes 35S::AtEB1A:GFP et AtEB1a::AtEB1a:GFP. La zone étudiée correspond à la zone photoblanchie. L'échelle des couleurs va du bleu pour la vitesse la plus faible au rouge foncé pour la plus élevée : 11 $\mu\text{m}\cdot\text{min}^{-1}$ dans la cellule Endo-A et 5 $\mu\text{m}\cdot\text{min}^{-1}$ dans la cellule 35S. Barres = 5 μm dans l'image du haut et 10 μm dans l'image du bas. (IV) Histogramme décrivant la répartition des vitesses moyennes des trajectoires dans les plantes 35S::AtEB1A:GFP et AtEB1a::AtEB1a:GFP. Les barres d'erreur représentent la SEM.

Les algorithmes permettant à plusTipTracker de reconstruire les trajectoires des comètes lui permettent aussi d'en déduire, par extrapolation, les événements de catastrophe et de sauvetage ainsi que les vitesses de dépolymérisation. Ce qui veut dire que plusTipTracker nous donne accès à tous les paramètres de la dynamique des MTs. Il ressort de l'analyse, que la dynamique des MTs (i.e les fréquences de catastrophe et de sauvetage) n'est pas modifiée entre les plantes exprimant AtEB1a sous contrôle du promoteur endogène et celles l'exprimant sous contrôle du promoteur 35S.

En conclusion, la comparaison de lignées de plantes ayant des niveaux d'expression de AtEB1 différents a permis de mettre en évidence un effet inhibiteur de AtEB1a sur la vitesse de polymérisation des MTs.

3) Analyse du phénotype du double mutant *eb1a-2 eb1b-3*.

Pour analyser plus avant les effets d'AtEB1 sur les MTs, nous avons étudié les conséquences des pertes de fonction concomitantes de AtEB1a et de AtEB1b sur la dynamique et l'architecture du réseau microtubulaire cortical. Nous avons utilisé pour cela un double mutant, de type perte de fonction, pour les gènes *AtEB1a* et *AtEB1b* (Komaki et al., 2010). Nous avons analysé des plantules exprimant de façon stable la protéine chimère GFP-tubuline- α (GFP-TuA6) dans un contexte génétique sauvage et chez le double mutant *eb1a-2, eb1b-3* (Komaki et al., 2010). Cette lignée nous permet donc d'évaluer l'implication des deux paralogues cytosoliques de EB1 dans l'architecture du réseau corticale de MTs et dans la dynamique des MTs.

a) La Dynamique des MTs chez le double mutant *eb1a-2 eb1b-3* est peu affectée

Contrairement au marquage par AtEB1-GFP étudié précédemment, le marquage GFP-TuA6 sur toute la longueur des MTs permet d'analyser les événements de polymérisation, dépolymérisation, le temps moyen passé en catastrophe, et la fréquence de catastrophe survenant sur les MTs en traçant des kymographes à l'aide du logiciel KymoToolBox. Les histogrammes obtenus n'indiquent pas de modification des vitesses de polymérisation et de dépolymérisation des MTs en l'absence de AtEB1a et de AtEB1b (Fig. 6-II et III). Les subtiles différences constatées ne sont pas significatives d'après un test T de Student avec $\alpha = 0.05$. En revanche, le temps moyen passé par un MT en catastrophe et la fréquence de catastrophe semblent tous deux augmentés chez le double mutant (Fig. 6 IV et V). Ces observations, bien que préliminaires, suggèrent une implication de AtEB1a et/ou de AtEB1b

dans la régulation de la dynamique des MTs (i.e AtEB1a/b ne semble modifier que les fréquences de transitions).

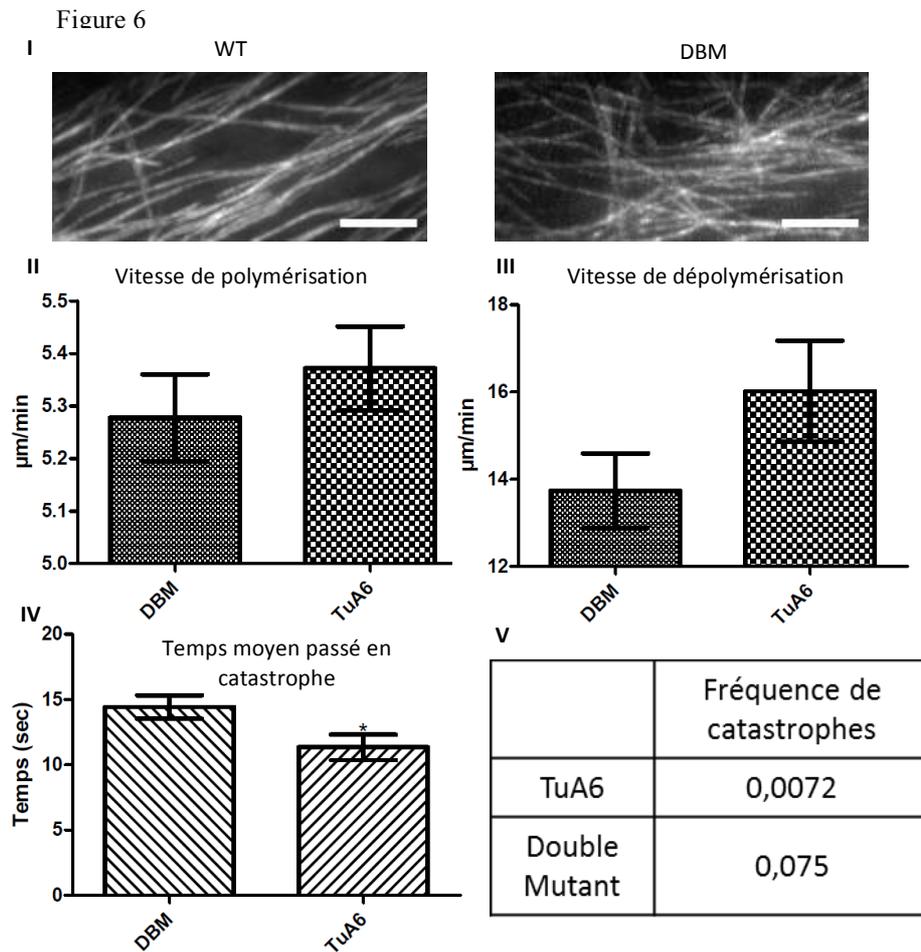


Figure 6 : Organisation et dynamique des MTs chez le double mutant *eb1a-2 eb1b-3*. (I) « Maximum intensity projections » de 125 images acquises au cours du temps après photoblanchiment dans une cellule épidermique (intervalle de temps de 2 secondes entre chaque acquisition). Image de gauche : contrôle - les MTs marquées par la protéine rapporteur TuA6 sont parallèles entre eux et s'organisent en faisceaux caractéristiques. Image de droite : mutant - les faisceaux de MTs sont désorganisés du fait d'un manque de « parallélisme » entre MTs. Barres = 5µm. (II) Vitesse de polymérisation en $\mu\text{m}\cdot\text{min}^{-1}$, semblable chez le double mutant ou dans des plantes sauvages (toutes exprimant de façon stable GFP-TuA6). Les barres d'erreur représentent la « Standard Error to the Mean » (SEM). (III) Vitesse de dépolymérisation en $\mu\text{m}\cdot\text{min}^{-1}$, semblable chez le double mutant ou chez les plantes sauvages. Les barres d'erreur représentent la SEM. (IV) Temps moyen passé par un MT en catastrophe dans une plante double mutante ou dans une plante sauvage. Notez la différence statistique existant entre les deux lignées. Les barres d'erreur représentent la SEM. (V) Fréquences de catastrophe obtenues dans les plantes double mutante et sauvage.

b) L'organisation en faisceau est perturbée chez le mutant

Le réseau microtubulaire apparaît nettement désorganisé chez le double mutant (Fig. 6-I). Les MTs bien alignés des cellules d'hypocotyle sauvage laissent en effet la place à un réseau apparemment anarchique, bien qu'une certaine variabilité apparaisse d'une cellule à

l'autre et à l'intérieur d'une même cellule. Ce phénotype pourrait s'expliquer par une perte de la capacité à former des faisceaux de MTs.

Au cortex des cellules d'hypocotyle, les MTs se forment généralement en suivant les MTs préexistants, ce qui conduit à la formation d'un réseau parallèle. Afin de tester la capacité des MTs à adopter ce comportement chez le double mutant, nous avons enregistré l'organisation des MTs à un temps donné dans une zone d'intérêt, procédé au photoblanchiment de cette zone, et analyser le processus de croissance des nouveaux MTs dans cette zone. La comparaison de la distribution des MTs néoformés à celle des MTs photoblanchis donne des informations sur la capacité des MTs à s'organiser en faisceau. Les résultats montrent que, chez la plantule sauvage exprimant la chimère GFP-TuA6, les MTs néoformés suivent majoritairement les MTs préexistants (photoblanchis) (Fig. 7-I). En revanche, chez le double mutant, les MTs semblent croître sans direction privilégiée et sans tenir compte des MTs préexistants. Les MTs se croisent volontiers et polymérisent, mais semblent avoir des difficultés à s'auto-organiser en faisceau bien compact. Cela aboutit à un réseau très désorganisé, même s'il subsiste des cellules ou des régions de certaines cellules apparemment épargnées. Ce dysfonctionnement devrait aboutir logiquement à des variations de taille de faisceaux. Le pouvoir résolutif des instruments d'optique photonique conventionnels ne permet pas de compter le nombre de MTs par faisceau cortical. Pour tester notre hypothèse nous nous sommes intéressés à des méthodes d'observations super-résolutives.

Les méthodes de super-résolution qui visent à réduire le diamètre de la tache de Airy par le traitement mathématique (PALM, STORM) ou par l'usage d'un laser de déplétion très puissant (STED) permettent d'améliorer d'un facteur de 2 à 10 la résolution latérale. Ces approches devraient donc nous permettre de dénombrer les MTs dans chacun des faisceaux observés en microscopie confocale conventionnelle au cortex des cellules d'hypocotyle.

Nous avons eu l'opportunité de tester notre hypothèse par microscopie STED (collaboration avec Jim Dompierre, Imagif). Comme on le voit dans la partie (I) de la figure 7, le STED, en augmentant la résolution, nous permet de compter le nombre de MTs constituant les trajectoires observées en microscopie confocale. Ainsi, chez les plantes sauvages, les faisceaux de MTs sont généralement composés de 2 à 3 MTs parallèles

Figure 7

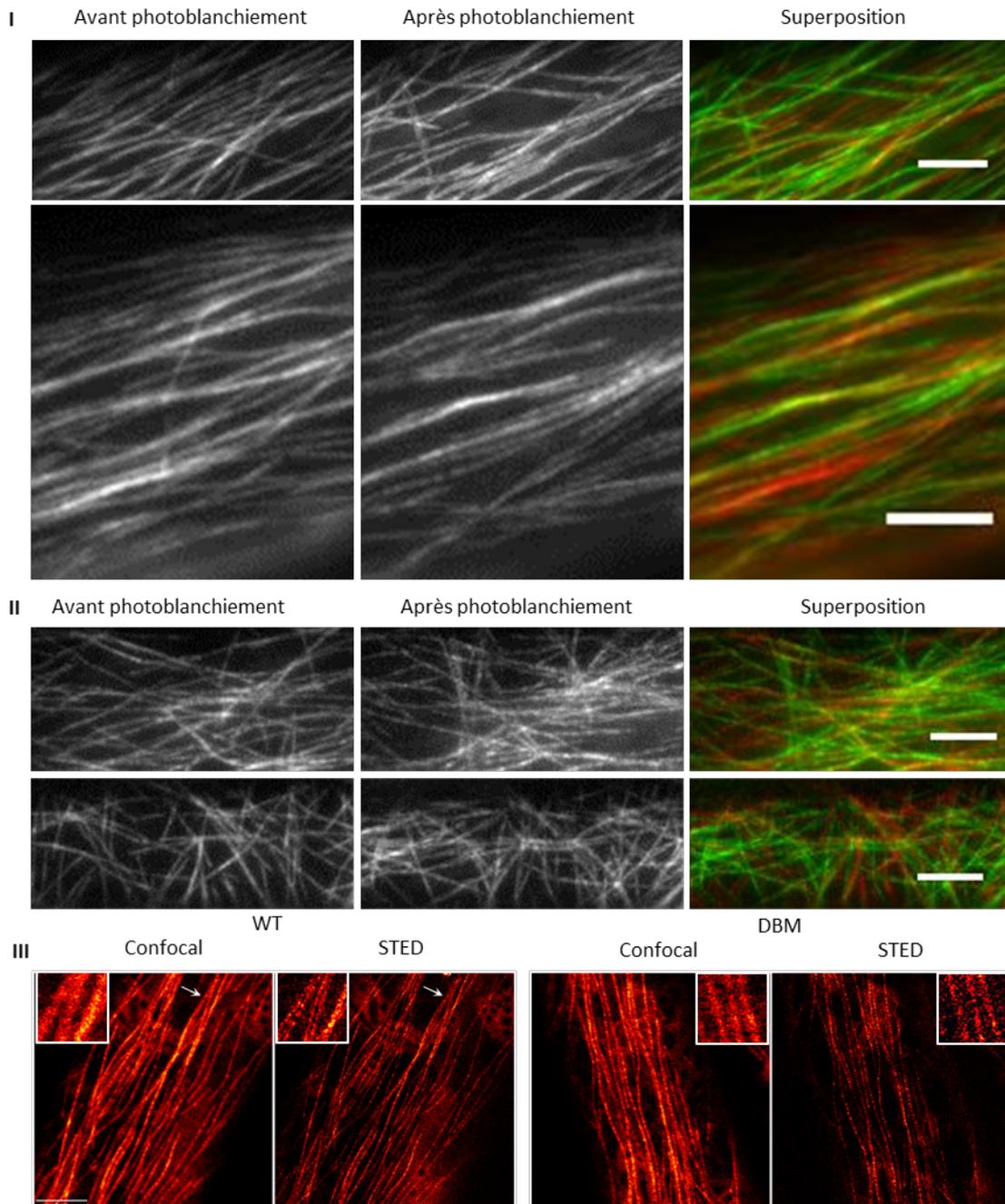


Figure 7 : Comparaison de l'organisation du réseau microtubulaire entre les plantes exprimant TuA6-GFP en fond génétique sauvage ou en double mutant. (I) et (II) à gauche, « Maximum intensity projection » (MIP) des 7 images précédant le photoblanchiment. Au milieu, MIP des 125 images suivant le photoblanchiment. A droite, superposition des MIPs précédant (rouge) et suivant (vert) le photoblanchiment. Barres = 5 μ m. (I) deux exemples de reformation de MTs après FRAP dans une plante sauvage exprimant GFP-TuA6. Les tracés des MTs néoformés sont parallèles. (II) deux exemples de reformations des MTs dans une plante mutée pour AtEB1a et b et exprimant GFP-TuA6. Les MTs néoformés ne s'organisent pas en faisceau. (III) Comparaison des images obtenues en microscopie confocale et en STED sur les plantes. La résolution obtenue en STED permet de compter le nombre de MTs dans un faisceau (flèches blanches). Les faisceaux de MTs observés en microscopie confocale dans les plantes sauvages sont composés d'un nombre plus important de MTs que dans les plantes mutantes. Barre = 5 μ m.

En revanche, chez le double mutant, les fibres microtubulaires corticales ne contiennent le plus souvent qu'un seul MT.

AtEB1a et/ou AtEB1b semblent donc impliquées directement ou indirectement dans la formation de faisceaux de MTs. Cette incapacité à former des faisceaux de MTs est-elle liée à la désorganisation du réseau microtubulaire corticale observée chez le double mutant ? Existe-t-il un lien de cause à effet entre diminution de la dynamique des MTs et la disparition des faisceaux corticaux ? Autant de questions fascinantes que nous aborderons lors de la discussion.

4) Exploration des interactions AtEB1 / endomembranes.

Les données précédentes suggèrent que AtEB1 pourrait avoir un rôle sur la régulation de la dynamique des MTs et sur leur arrangement en faisceau. Un autre objectif de notre étude était de confirmer les données de Jaideep Mathur montrant une interaction avec le réticulum endoplasmique (Mathur et al., 2003).

Pour répondre à cette question nous avons exprimé de manière transitoire le marqueur du réticulum endoplasmique HDEL-mCherry dans la lignée stable 35S::AtEB1a:GFP. Le réticulum apparaît alors comme un réseau tubulaire caractéristique (Fig. 8-I). La présence de « ER Bodies » mobiles dans le lumen est souvent décrite dans la littérature comme une réaction au stress de la transformation. La distribution caractéristique de AtEB1 décrit précédemment dans les cellules de l'hypocotyle est retrouvée dans les cotylédons : des comètes fluorescentes marquant l'extrémité des MTs et un marquage plus discret du corps des MTs (Fig.8-II). Dans la plupart des cellules, la superposition des deux marquages de fluorescence montre une proximité certaine entre AtEB1 et membranes du réticulum (encarts Fig. 8-I). Plus rarement, dans certaines cellules, la colocalisation est quasi-totale entre les deux marquages. (Fig. 8-II)

Ces résultats préliminaires vont dans le sens d'une association de AtEB1 avec le réticulum, et définirait alors une capacité de AtEB1a, à se localiser à la fois sur les extrémités (+) des MTs et sur la membrane du RE. Il est cependant prématuré d'associer proximité avec une interaction physique directe entre AtEB1 et la membrane du RE.

Afin de voir si AtEB1 a un rôle sur la morphogenèse du réticulum, nous avons également exprimé de manière transitoire le marqueur du réticulum endoplasmique HDEL-mCherry dans la lignée double mutant *eb1a-2 eb1b-3* exprimant la fusion GFP-TuA6. Les

observations ne nous ont pas permis de mettre en évidence des modifications drastiques de la morphologie ou de la dynamique du RE. Une étude plus détaillée sera nécessaire pour confirmer ou infirmer une interaction fonctionnelle entre ER et MTs *via* AtEB1.

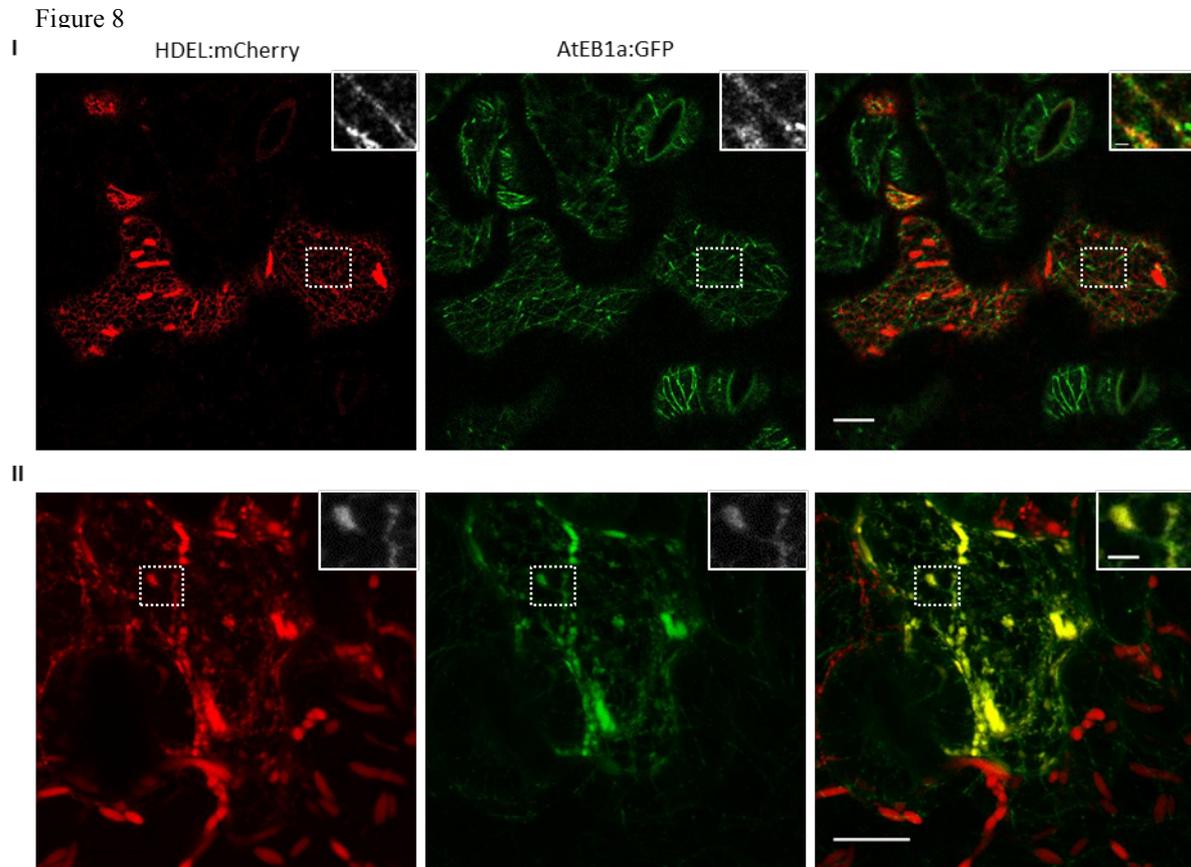


Figure 8 : Localisation de AtEB1a-GFP et HDEL-mCherry dans une cellule épidermique de feuille. (I) Première image d'un film, deux cellules exprimant à la fois le marqueur du RE et AtEB1a:GFP. Barre = 10 μ m. Les détails des encarts révèlent une colocalisation discrète de AtEB1a avec le RE intervenant à la 50^{ème} seconde du film. Barre = 2 μ m. (II) Dans certaines cellules AtEB1a:GFP colocalise parfaitement avec le marqueur du RE. MIP d'une pile d'image en épaisseur. Barre = 10 μ m. Détails de la colocalisation dans l'encart. Barre = 2 μ m.

Discussion

Nos résultats ont permis de montrer que la vitesse de polymérisation des MTs pouvait être liée aux conditions de surexpression de AtEB1. Ils suggèrent également que AtEB1a et/ou AtEB1b pourrait jouer un rôle dans la formation des faisceaux de MTs caractéristiques des cellules végétales. Ces données, intégrées aux observations d'une interaction possible entre AtEB1 et le réticulum endoplasmique sont discutées dans le contexte d'un dialogue AtEB1 et endomembranes dans les cellules végétales.

1) AtEB1 est un élément régulateur de la dynamique des microtubules.

Le tableau ci-dessous intègre nos données sur la vitesse de polymérisation des MTs dans différents fonds génétiques et selon des méthodes de calcul différentes. Avant de pouvoir conclure sur une relation fonctionnelle entre AtEB1 et vitesse de polymérisation des MTs, il est important de se demander dans quelle mesure les conditions expérimentales influent sur ce paramètre.

Vitesses de polymérisation moyennes obtenues dans chacun des géotypes avec les deux logiciels utilisés.

Géotypes	Vitesse de polymérisation moyenne ($\mu\text{m}/\text{min}$)	Logiciel utilisé	Nombre de trajectoires analysées	Nombre de films analysés	Nombre de plantes utilisées
pEb1a::Eb1a:GFP	7,9	KymoToolBox	219	9	2
pEb1a::Eb1a:GFP	7,0	plusTipTracker	1528	6	2
pEb1b::Eb1b:GFP	8,2	KymoToolBox	416	10	3
p35S::Eb1a:GFP	6,9	KymoToolBox	1663	4	2
p35S::Eb1a:GFP	3,8	plusTipTracker	340	10	2
p35S::Eb1a:mCherry	6,8	KymoToolBox	393	13	3
eb1a-2 eb1b-3	5,3	KymoToolBox	314	17	4
WT	5,4	KymoToolBox	171	8	4

Tableau 6 : description des vitesses moyennes, du nombre de plantes, du nombre de trajectoires et du nombre de film utilisés pour l'analyse des vitesses de polymérisation en fonction du logiciel.

Des modes de calculs de la vitesse de polymérisation à affiner ?

L'utilisation de deux logiciels semble indiquer un effet négatif de AtEB1a sur la vitesse de polymérisation des MTs lorsque cette protéine est surexprimée. Pourtant, tout en fournissant le même constat, une diminution de la vitesse de polymérisation dans les plantes sur-exprimant AtEB1a, les deux approches fournissent des vitesses moyennes différentes. Ainsi avec KymoToolBox nous obtenons des vitesses moyennes de $7,85 \mu\text{m}\cdot\text{min}^{-1}$ pour les plantes

Endo-A-GFP et de $6,93 \mu\text{m}\cdot\text{min}^{-1}$ pour les plantes 35S-A-GFP alors que plusTipTracker indique des vitesses de respectivement $7,06 \mu\text{m}\cdot\text{min}^{-1}$ et $3,62 \mu\text{m}\cdot\text{min}^{-1}$. Alors que l'approche manuelle aboutit à une différence d'environ 15%, l'approche automatisée aboutit à une différence de presque 100%. Les deux analyses ne sont donc pas équivalentes, l'approche informatisée semble être beaucoup plus sensible que l'approche traditionnelle. Toutefois l'approche automatisée a pu elle aussi être biaisée par le marquage résiduel du corps des MTs constaté lors de la surexpression de AtEB1a.

Les effets d'AtEB1 sur la polymérisation dépendent d'un seuil de concentration d'AtEB1 ?

Quelle que soit la méthode, nos résultats sur les lignées sur-expressseurs suggèrent un effet négatif d'une surexpression de AtEB1 sur la polymérisation. Ce résultat est à priori contradictoire d'une part avec les données issues de l'étude du double mutant AtEB1a/b, et d'autre part avec une étude comparative avec les données issues d'expériences *in vitro*. En effet, l'analyse du double mutant eb1a-2 eb1b-3 n'a pas révélé de modification majeure de la dynamique des MTs, suggérant peu d'effet d'AtEB1 sur la vitesse de polymérisation des MTs. La petite différence de fréquence de catastrophe mesurée peut provenir d'une trop faible quantité de trajectoires analysées. Surtout que l'absence de méthodologie permettant de faire des tests statistiques sur les fréquences interdit de trancher sur la fiabilité du résultat obtenu.

L'analyse de la vitesse de polymérisation des MTs dans les plantes TuA6-GFP suggère quant à elle que AtEB1 a un effet plutôt positif sur la polymérisation des MTs. En effet, la vitesse mesurée de $5,4 \mu\text{m}\cdot\text{min}^{-1}$, est très inférieure à celles mesurées dans les plantes Endo-A-GFP ou Endo-B-GFP de l'ordre de $8 \mu\text{m}/\text{min}^{-1}$. Or il est probable que les plantes exprimant les fusions de AtEB1 à la GFP sous contrôle des promoteurs endogènes, possèdent une quantité de AtEB1 légèrement supérieure à celles des plantes « sauvages » TuA6-GFP. D'ailleurs, une légère surexpression dans les plantes Endo-B expliquerait la différence de vitesse de polymérisation constatée entre ces plantes et les plantes Endo-A. La légère différence de fluorescence moyenne constatée entre les protoplastes issus de plantes Endo-A (15 UA) et Endo-B (25 UA) est un élément allant dans ce sens. Ce résultat irait donc plutôt dans le sens d'un effet positif *in vivo* d'AtEB1 sur la vitesse de polymérisation, comme démontré pour des MTs *in vitro* (Vitre et al., 2008).

Une hypothèse de travail. Au vu de l'ensemble de ces données, nous faisons l'hypothèse que l'effet de AtEB1 sur la vitesse de polymérisation des MTs soit positif à faible dose, et négatif à partir d'un certain seuil. Nous pensons que la diminution de vitesse de polymérisation dans

les plantes sur-exprimant AtEB1a ne révèlent pas nécessairement l'effet direct de AtEB1a sur les MTs. Ainsi le recrutement par AtEB1a via son domaine EBH, d'un partenaire peu présent dans la cellule mais ayant un puissant effet inhibiteur sur la vitesse de polymérisation des MTs peut expliquer l'effet constaté lors de la surexpression. In vivo, il pourrait exister des protéines, non encore identifiées chez les plantes, ayant des effets bien plus importants, que AtEB1 sur la dynamique des MTs, ce qui expliquerait l'absence de modifications de la dynamique des MTs dans le double mutant. De nouvelles expériences, in vitro, lors desquelles tous les paramètres sont contrôlés et notamment la quantité de protéine AtEB1a et/ou AtEB1b, ainsi que la recherche de partenaires de AtEB1, permettraient de trancher ces questions. Enfin il faut tenir compte du fait que la surexpression de chimère tubuline-GFP peut aussi perturber la dynamique des MTs (Burke et al., 1989).

2. AtEB1 intervient dans l'organisation du réseau microtubulaire

La désorganisation du réseau de MTs, constatée lors de l'observation du double mutant *eb1a-2 eb1b-3*, indique que AtEB1a et/ou AtEB1b participent à la mise en place et à la régulation de l'architecture du réseau cortical de MTs. La formation des faisceaux de MTs est décrite par (Ehrhardt, 2008) comme se faisant soit par l'interaction latérale des MTs lors de la nucléation parallèle soit par l'interaction frontale d'un MT en croissance avec le corps d'un MT déjà existant. De plus, la formation et la persistance des faisceaux sont envisagées comme étant un facteur important permettant l'organisation du réseau microtubulaire cortical. L'effet observé peut, de ce fait, être causé par une modification de la fréquence des événements de nucléation parallèle et/ou par un affaiblissement des interactions frontales. En effet, EB1 est localisée au centrosome chez les animaux (Louie et al., 2004) et impliquée dans la nucléation des MTs et la formation des faisceaux de MTs (Bu and Su, 2001). L'implication de AtEB1 dans la nucléation des MTs a d'ailleurs été suggérée par Chan et al (2003). L'observation détaillée des interactions entre MTs et l'utilisation de marqueurs des sites/événements de nucléation, associée à une microscopie photonique à haute résolution devrait permettre de comprendre l'implication de AtEB1 dans l'organisation du réseau de MTs.

3. Interactions microtubules, AtEB1 et membranes

Nos résultats d'expression transitoires d'un marqueur du RE dans des plantes *35S::AtEB1a:GFP*, comme ceux de Mathur et al. (2003), montrent une colocalisation possible d'AtEB1 avec la membrane du RE. Malheureusement l'interprétation de ces résultats est limitée par la résolution atteinte avec les systèmes d'imagerie classiques. L'emploi de la

microscopie photonique à haute résolution (STED, PALM, STORM) permettrait probablement de mieux décrire la relation existant entre AtEB1 et la membrane du RE. La question du de l'interaction et du rôle de cette interaction, des MTs dans la morpho-dynamique du réticulum endoplasmique, ou sur d'autres entités membranaires reste entière. Il existe d'autres membranes avec lesquelles les MTs interagissent, notamment la membrane plasmique (Newcomb and Bonnett, 1965). En effet, le dialogue MTs – membrane plasmique – microfibrilles de cellulose est une interface MTs – membrane qui est très largement étudiée dans la littérature. Tout comme l'est l'interaction MTs – membrane plasmique dans les voies de l'endocytose et de l'exocytose (Boutte et al., 2007). Elargir le champ d'investigation en recherchant, dans les mutants ou les lignées surexpresseurs de AtEB1, des altérations de ces deux interfaces bien décrites dans la littérature permettra de mieux comprendre les interactions MT – membranes en général.

Perspectives

1. Se rapprocher de conditions endogènes

Il sera essentiel pour valider nos hypothèses de travail de se rapprocher au maximum de conditions physiologique. Pour cela, il faudrait d'une part optimiser les conditions d'observations de la plante pour limiter le stress. En effet, la grande sensibilité des plantules à l'environnement (gravitropisme, phototropisme, thigmotropisme, etc...) nécessite de prendre de nombreuses précautions lors de la manipulation des plantes, sous peine d'étudier le rôle de AtEB1 dans les réponses de la plantes à ces stimuli (Gleeson et al., 2012) plutôt que d'étudier le rôle d'AtEB1 sur la dynamique des MTs. Il est envisagé, pour éviter les biais dus à la manipulation, d'utiliser des techniques de cultures des plantes autorisant le passage de la chambre de culture au microscope sans nécessité de manipulation de la plante elle-même mais seulement du support de croissance (« Root chips », collaboration M. Bianchi et S. Thomine).

Un investissement de temps dans les techniques d'analyses d'images devrait aussi nous aider à affiner les données quantitatives de nos expériences. Dans le but d'utiliser plusTipTracker sur les plantes 35S::AtEB1a:GFP, nous développerons une méthode de traitement des images permettant d'ôter le signal résiduel présent sur le corps des MTs. D'autre part, vu les biais possiblement causés par les techniques de surexpression, il faudrait mesurer la vitesse de polymérisation des MTs par des moyens ne perturbant pas le système.

L'obtention d'anticorps reconnaissant spécifiquement chacune des trois AtEB1 permettrait de répondre en partie à cette question, en offrant la possibilité de comparer la

quantité de AtEB1a,b et c dans les plantes sauvages à celle des plantes utilisées dans cette étude.

2. Des approches complémentaires.

Pour évaluer les effets d'AtEB1 sur les MTs, et en s'affranchissant des autres protéines, des systèmes reconstitués *in vitro* pourraient être utilisés comme cela a été fait pour les EB1 de mammifères.

De plus, la création de nouvelles lignées rapporteurs, utilisant d'autres PF et d'autres promoteurs permettra de juger de l'effet de la fusion de la tubuline à une PF et de l'effet de la sur-expression de cette chimère sur la vitesse de polymérisation des MTs. Le croisement de lignées rapporteurs de AtEB1 avec des lignées rapporteurs des MTs permettra aussi de mieux comprendre cette différence de vitesse.

Ensuite, la construction de nouvelles lignées rapporteurs, utilisant d'autres protéines fluorescentes, nous offrira la possibilité de comprendre l'éventuel phénotype des plantes GFP-TuA6. Le croisement des lignées rapporteurs des MTs avec les lignées AtEB1-GFP autorisera l'exploration détaillée de l'association de AtEB1 avec les MTs. Le rôle potentiel de AtEB1 dans la nucléation des MTs sera analysé grâce à l'utilisation de marqueurs spécifiques de cet événement (γ -TuRC, Ton, etc...).

3. Etudier le rapport AtEB1/Microtubules/membranes dans d'autres configurations subcellulaires

Utilisant les outils précédemment décrits, il serait intéressant de regarder le cas des cellules en division, ou de cellules présentant des réseaux de MTs organisés différemment (tubes polliniques). Il serait aussi intéressant de vérifier les associations actine/MTs puisque l'actine est très impliquée dans la dynamique membranaire.

Enfin, une meilleure description de l'interaction MTs – membrane se fera à la fois par l'utilisation de drogues (oryzaline, latrunculine, bréfeldine A) perturbant l'un ou l'autre des acteurs et par la recherche, dans les mutants AtEB1, de perturbations des interactions MTs – membranes décrites dans la littérature.

Somme toute, ces études contribueraient à comprendre le rôle d'AtEB1 chez les plantes, son évolution de fonction dans le règne eucaryote, et le rôle des MTs dans l'organisation subcellulaire des endomembranes.

Bibliographie

- Akhmanova A, Steinmetz MO** (2008) Tracking the ends: a dynamic protein network controls the fate of microtubule tips. *Nat Rev Mol Cell Biol* **9**: 309-322
- Akhmanova A, Steinmetz MO** (2010) Microtubule +TIPs at a glance. *J Cell Sci* **123**: 3415-3419
- Applegate KT, Besson S, Matov A, Bagonis MH, Jaqaman K, Danuser G** (2011) plusTipTracker: Quantitative image analysis software for the measurement of microtubule dynamics. *Journal of structural biology* **176**: 168-184
- Bieling P, Laan L, Schek H, Munteanu EL, Sandblad L, Dogterom M, Brunner D, Surrey T** (2007) Reconstitution of a microtubule plus-end tracking system in vitro. *Nature* **450**: 1100-1105
- Boutte Y, Vernhettes S, Satiat-Jeuemaitre B** (2007) Involvement of the cytoskeleton in the secretory pathway and plasma membrane organisation of higher plant cells. *Cell biology international* **31**: 649-654
- Brandizzi F, Wasteneys GO** (2013) Cytoskeleton-Dependent Endomembrane Organization in Plant Cells: An Emerging Role for Microtubules. *The Plant journal : for cell and molecular biology*
- Bu W, Su LK** (2001) Regulation of microtubule assembly by human EB1 family proteins. *Oncogene* **20**: 3185-3192.
- Burke D, Gasdaska P, Hartwell L** (1989) Dominant effects of tubulin overexpression in *Saccharomyces cerevisiae*. *Molecular and Cellular Biology* **9**: 1049-1059
- Cabeen MT, Jacobs-Wagner C** (2010) The bacterial cytoskeleton. *Annual review of genetics* **44**: 365-392
- Cao L, Wang L, Zheng M, Cao H, Ding L, Zhang X, Fu Y** (2013) Arabidopsis AUGMIN Subunit 8 Is a Microtubule Plus-End Binding Protein That Promotes Microtubule Reorientation in Hypocotyls. *The Plant cell*
- Chan J, Calder GM, Doonan JH, Lloyd CW** (2003) EB1 reveals mobile microtubule nucleation sites in Arabidopsis. *Nature cell biology* **5**: 967-971
- Coquelle FM, Vitre B, Arnal I** (2009) Structural basis of EB1 effects on microtubule dynamics. *Biochem Soc Trans* **37**: 997-1001
- Desai A, Mitchison TJ** (1997) Microtubule polymerization dynamics. *Annu. Rev. Cell Dev. Biol* **13**: 83-117
- dit Frey NF, Muller P, Jammes F, Kizis D, Leung J, Perrot-Rechenmann C, Bianchi MW** (2010) The RNA binding protein Tudor-SN is essential for stress tolerance and stabilizes levels of stress-responsive mRNAs encoding secreted proteins in Arabidopsis. *The Plant cell* **22**: 1575-1591
- Dixit R, Chang E, Cyr R** (2006) Establishment of polarity during organization of the acentrosomal plant cortical microtubule array. *Molecular biology of the cell* **17**: 1298-1305
- Ehrhardt DW** (2008) Straighten up and fly right: microtubule dynamics and organization of non-centrosomal arrays in higher plants. *Current opinion in cell biology* **20**: 107-116
- Fishel EA, Dixit R** (2013) Role of nucleation in cortical microtubule array organization: variations on a theme. *The Plant journal : for cell and molecular biology*
- Fjorback AW, Seaman M, Gustafsen C, Mehmedbasic A, Gokool S, Wu C, Militz D, Schmidt V, Madsen P, Nyengaard JR, Willnow TE, Christensen EI, Mobley WB, Nykjaer A, Andersen OM** (2012) Retromer binds the FANSHY sorting motif in SorLA to regulate amyloid precursor protein sorting and processing. *The Journal of neuroscience : the official journal of the Society for Neuroscience* **32**: 1467-1480
- Gardiner J** (2013) The evolution and diversification of plant microtubule-associated proteins. *The Plant journal : for cell and molecular biology*
- Gleeson L, Squires S, Bisgrove SR** (2012) The microtubule associated protein END BINDING 1 represses root responses to mechanical cues. *Plant science : an international journal of experimental plant biology* **187**: 1-9

- Grigoriev I, Gouveia SM, van der Vaart B, Demmers J, Smyth JT, Honnappa S, Splinter D, Steinmetz MO, Putney JW, Jr., Hoogenraad CC, Akhmanova A** (2008) STIM1 is a MT-plus-end-tracking protein involved in remodeling of the ER. *Curr Biol* **18**: 177-182
- Hall A, Nobes CD** (2000) Rho GTPases: molecular switches that control the organization and dynamics of the actin cytoskeleton. *Philosophical transactions of the Royal Society of London. Series B, Biological sciences* **355**: 965-970
- Harada A, Takei Y, Kanai Y, Tanaka Y, Nonaka S, Hirokawa N** (1998) Golgi vesiculation and lysosome dispersion in cells lacking cytoplasmic dynein. *J Cell Biol* **141**: 51-59
- Komaki S, Abe T, Coutuer S, Inze D, Russinova E, Hashimoto T** (2010) Nuclear-localized subtype of end-binding 1 protein regulates spindle organization in Arabidopsis. *J Cell Sci* **123**: 451-459
- Laemmli UK** (1970) Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T4. *Nature* **227**: 680-685
- Ledbetter MC, Porter KR** (1963) A "Microtubule" in Plant Cell Fine Structure. *The Journal of cell biology* **19**: 239-250
- Louie RK, Bahmanyar S, Siemers KA, Votin V, Chang P, Stearns T, Nelson WJ, Barth AI** (2004) Adenomatous polyposis coli and EB1 localize in close proximity of the mother centriole and EB1 is a functional component of centrosomes. *Journal of cell science* **117**: 1117-1128
- Mathur J, Mathur N, Kernebeck B, Srinivas BP, Hulskamp M** (2003) A novel localization pattern for an EB1-like protein links microtubule dynamics to endomembrane organization. *Curr Biol* **13**: 1991-1997
- Maurer SP, Bieling P, Cope J, Hoenger A, Surrey T** (2011) GTP γ S microtubules mimic the growing microtubule end structure recognized by end-binding proteins (EBs). *Proc Natl Acad Sci U S A* **108**: 3988-3993
- Morrison EE** (2007) Action and interactions at microtubule ends. *Cell. Mol. Life Sci* **64**: 307-317
- Nelson BK, Cai X, Nebenfuhr A** (2007) A multicolored set of in vivo organelle markers for co-localization studies in Arabidopsis and other plants. *The Plant journal : for cell and molecular biology* **51**: 1126-1136
- Newcomb EH, Bonnett HT** (1965) Cytoplasmic Microtubule and Wall Microfibril Orientation in Root Hairs of Radish. *The Journal of cell biology* **27**: 575-589
- Rasmussen CG, Wright AJ, Muller S** (2013) The role of the cytoskeleton and associated proteins in determination of the plant cell division plane. *The Plant journal : for cell and molecular biology*
- Satiat-Jeunemaitre B** (1989) Microtubules, microfibrilles pariétales et morphogénèse végétale : cas des cellules en extension. *Bull. Soc. bot. Fr.* **136**: 87-98.
- Schuyler SC, Pellman D** (2001) Microtubule "plus-end-tracking proteins". the end is just the beginning. *Cell* **105**: 421-424.
- Su LK, Burrell M, Hill DE, Gyuris J, Brent R, Wiltshire R, Trent J, Vogelstein B, Kinzler KW** (1995) APC binds to the novel protein EB1. *Cancer Res* **55**: 2972-2977.
- Till BJ, Reynolds SH, Greene EA, Codomo CA, Enns LC, Johnson JE, Burtner C, Odden AR, Young K, Taylor NE, Henikoff JG, Comai L, Henikoff S** (2003) Large-scale discovery of induced point mutations with high-throughput TILLING. *Genome research* **13**: 524-530
- Ueda K, Matsuyama T, Hashimoto T** (1999) Visualization of microtubules in living cells of transgenic Arabidopsis thaliana. *Protoplasma* **206**: 201-206
- Vitre B, Coquelle FM, Heichette C, Garnier C, Chretien D, Arnal I** (2008) EB1 regulates microtubule dynamics and tubulin sheet closure in vitro. *Nature cell biology* **10**: 415-421
- Wickstead B, Gull K** (2011) The evolution of the cytoskeleton. *The Journal of cell biology* **194**: 513-525