



Etude des mécanismes moléculaires responsables de l'organisation des microtubules et de leur interaction avec l'actine par la protéine tau

Auréliane Elie

► To cite this version:

Auréliane Elie. Etude des mécanismes moléculaires responsables de l'organisation des microtubules et de leur interaction avec l'actine par la protéine tau. Sciences agricoles. Université Grenoble Alpes, 2015. Français. NNT : 2015GREAV067 . tel-01684762

HAL Id: tel-01684762

<https://theses.hal.science/tel-01684762>

Submitted on 15 Jan 2018

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

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

THÈSE

Pour obtenir le grade de

DOCTEUR DE L'UNIVERSITÉ GRENOBLE ALPES

Spécialité : **Neurosciences - Neurobiologie**

Arrêté ministériel : 7 août 2006

Présentée par

Auréliane ELIE

Thèse dirigée par **Isabelle ARNAL**

préparée au sein de l'**Institut des Neurosciences de Grenoble - INSERM U836 - Equipe « Dynamique et Structure du Cytosquelette »**

dans l'**École Doctorale de Chimie et Sciences du Vivant**

Etude des mécanismes moléculaires responsables de l'organisation des microtubules et de leur interaction avec l'actine par la protéine tau

Thèse soutenue publiquement le **17 novembre 2015**,
devant le jury composé de :

Pr. Christian POÛS

Professeur - Université Paris-Sud 11 - **Rapporteur**

Dr. Nicolas SERGEANT

Directeur de recherche - JPARC Lille - **Rapporteur**

Dr. Rajaa BOJEMAA-PATERSKI

Maître de conférence - Université Joseph Fourier - **Examinatrice**

Dr. Frank PEREZ

Directeur de recherche - Institut Curie - **Examineur**

Dr. Marylin VANTARD

Directrice de recherche - GIN - **Présidente**

Dr. Isabelle ARNAL

Chargée de recherche - GIN - **Directrice de thèse**



Remerciements

Abréviations

+TIP : + end TrackIng Protein

aa : acide aminé

ABP : Actin Binding Protein

ADN : Acide DésoxyriboNucléique

ADP : Adénosine Di-Phosphate

APC : Adenomatous Polyposis Coli

ARNm : Acide RiboNucléique messenger

ATP : Adénosine Tri-Phosphate

BRB : Britton-Robinson Buffer

CLIP : Cytoplasmic LInker Protein

C-ter : extrémité carboxy-terminale

DCX : Doublecortine

DNF : Dégénérescence NeuroFibrillaire

DTT : DiThioThreitol

EB : End Binding

EGTA : Ethylene Glycol Tetraacetic Acid

FRAP : Fluorescent Recovery After Photobleaching

FRET : Fluorescence Resonance Energy Transfer

FTDP-17 : Fronto-Temporal Dementia and Parkinsonism linked to chromosome 17

GDP : Guanosine 5' DiPhosphate

GEF : Guanine nucleotide Exchange Factor

GFP : Green Fluorescent Protein

GMPCPP : Guanosine 5'- α - β -méthylène triphosphate

GSK3- β : Glycogene synthase kinase-3 β

GTP : Guanosine 5' TriPhosphate

IPTG : IsoPropyl-beta-Thio-Galactoside

IQGAP : IQ motif containing GTPase Activating Protein

kDa : kilo Dalton

KO : Knock-Out

LIS1 : Lissencephaly-1

M : Molaire

MA : Maladie d'Alzheimer

MAP : Microtubule-Associated Protein

MCAK : Mitotic Centromere Associated Kinesin

MCF7 : Michigan Cancer Foundation-7

ME : Microscopie Electronique

min : minute

MT : Microtubule

MTBD : Microtubule Binding Domain

NGF : Nerve Growth Factor

N-ter : extrémité amino-terminale

OP18 : OncoProtein 18

PBS : Phosphate Buffer Saline

PC12 : PheoChromocytoma-12

PCR : Polymerase Chain Reaction

PHF: Paired Helical Filament

Pipes : Piperazine-N,N'-bis (2-ethanesulfonic) acid

PRD : Proline-Rich Domain

REG : Réticulum Endoplasmique Granuleux

Rho : Ras Homolog gene family

SDS-PAGE : Sodium Dodecyl Sulfate PolyAcrylamide Gel Electrophoresis

STOP : Stable Tubule Only Polypeptide

TIRF : Total Internal Reflection Fluorescence

Tub : Tubuline

XKCM1 : Xenopus Kinesin Catastrophe Modulator-1

XMAP : Xenopus Microtubule Associated Protein

γ -TURC : γ TUbulin Ring Complex

Sommaire

Avant-propos	1
Chapitre I : Introduction	5
I- Structure, dynamique et organisation des microtubules et des filaments d'actine..	7
1. Les microtubules	7
a) La tubuline, unité de base du microtubule	7
b) Structure des microtubules	8
c) Le microtubule, un polymère dynamique	10
<i>i. La nucléation et l'élongation</i>	10
<i>ii. L'instabilité dynamique</i>	12
d) L'organisation spatiale des microtubules <i>in vivo</i>	17
e) Les MAPs : facteurs de régulation de l'instabilité dynamique et de l'organisation des microtubules	20
<i>i. Les MAPs structurales</i>	21
<i>ii. Les + TIPS</i>	28
<i>iii. Les protéines de déstabilisation</i>	29
<i>iiii. Les moteurs moléculaires</i>	30
2. L'actine	33
a) Base structurale du monomère et du filament d'actine	33
b) Polymérisation de l'actine <i>in vitro</i>	34
c) Les protéines de régulation de l'actine	36
II- Organisation et fonctions du cytosquelette dans les neurones	42
1. Rôle et organisation des microtubules dans le neurone	43
a) Nucléation des microtubules	43
b) Organisation des microtubules dans les neurites	44
c) Des microtubules de stabilités différentes	46
d) Rôles des microtubules dans la polarisation neuronale	47
e) Rôles des microtubules dans le compartiment synapto-dendritique	50
2. Rôle et organisation de l'actine dans le neurone	52
a) Rôle de l'actine dans le cône de croissance	52
b) Rôle de l'actine dans la synapse	53
c) Organisation et rôle de l'actine dans l'axone	55
3. Importances des interactions entre microtubules et actine dans le neurone.....	56
a) Rôle de l'interaction entre microtubules et actine dans la morphogenèse neuronale	57
b) Rôle de l'interaction entre microtubules et actine dans les épines dendritiques	59
c) Effecteurs connus et potentiels de l'interaction entre microtubules et actine dans les neurones	60
III- Tau, un acteur de l'organisation des microtubules et de l'actine	68
1. Epissage, isoformes et structure de tau	68

2. Structure de tau en solution	71
3. Sites d'interaction et structure de tau sur les microtubules	73
4. Effet de tau sur l'assemblage et la stabilisation des microtubules	76
5. Organisation des microtubules en faisceaux par tau.....	78
6. Interaction de tau avec l'actine	80
7. Autres partenaires et autres fonctions de tau	81
8. Pathologies liées à la protéine tau	84
a) Généralités	84
b) Phosphorylation anormale de tau et pathologies	87
c) Autres modifications post-traductionnelles de tau impliquées dans les pathologies	88
d) Troncation de tau	90
Objectifs de la thèse	93
Chapitre II : Etude de l'organisation des microtubules en faisceaux par tau.....	95
1. Résumé	97
2. Article	99
3. Résultats complémentaires	133
Chapitre III : Etude de l'interaction entre les microtubules et l'actine par tau	135
1. Résumé	137
2. Article	139
3. Résultats complémentaires	155
Chapitre IV : Conclusions et perspectives	161
Références	171
Annexes	197
Matériels et méthodes complémentaires	198
Article	203

Avant-propos

Le cytosquelette est un réseau dense de polymères protéiques qui tient une place essentielle dans le fonctionnement de la cellule eucaryote. En effet, il représente l'échafaudage qui permet de maintenir la forme de la cellule et, par ailleurs, sa capacité à se remodeler participe activement au développement, à la différenciation et au déplacement de la cellule. Il est également impliqué dans de nombreux processus cellulaires tels que le transport cytoplasmique de molécules et d'organites, la ségrégation des chromatides lors de la mitose ou des chromosomes lors de la méiose, ainsi que la cytokinèse qui fait suite à ces événements.

Le cytosquelette est constitué de trois types de fibres : les microtubules, les filaments d'actine et les filaments intermédiaires (Figure 1).

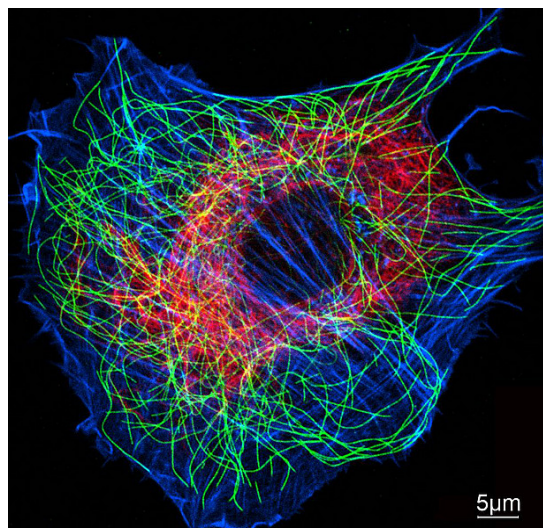


Figure 1. Positionnement des trois cytosquelettes dans la cellule. Les microtubules sont indiqués en vert, les filaments d'actine en bleu et les filaments intermédiaires en rouge (tiré de www.biozentrum.unibas.ch).

Une propriété importante de ces différents réseaux filamenteux est leur nature dynamique, qui leur permet de s'adapter en permanence aux besoins de la cellule. Au cours de ma thèse, je me suis particulièrement intéressée aux propriétés des microtubules et des filaments d'actine. La Figure 2 schématise l'organisation de ces deux cytosquelettes rencontrée dans différentes situations cellulaires : lorsqu'une cellule se divise, migre ou se différencie (ici en neurone). Pour un bon fonctionnement cellulaire, la régulation spatiale et temporelle des réseaux de microtubules et d'actine est primordiale. Elle fait intervenir différents facteurs, comme la température et le pH du milieu, mais aussi un grand nombre de protéines qui interagissent avec les filaments isolés et modulent leur assemblage, les relient les uns aux

autres (conduisant par exemple à la formation de faisceaux), et/ou les rattachent à divers composants de la cellule. La plupart des processus cellulaires nécessitent également une activité coopérative et synergique des microtubules et de l'actine. La compréhension des mécanismes sous-jacents à cette coopération commence juste à émerger et il reste de nombreux aspects à élucider, notamment au niveau des protéines établissant un lien, structural ou fonctionnel, entre les deux types de filament.

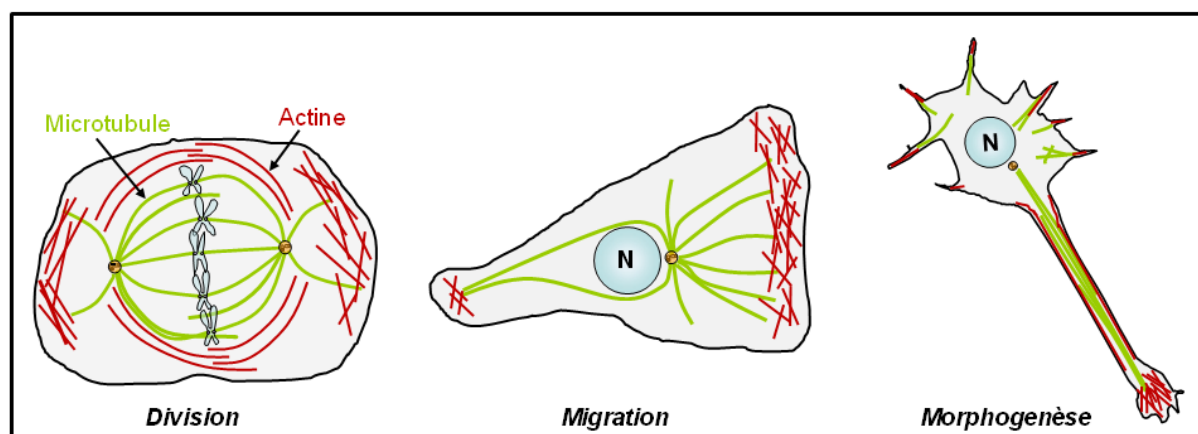


Figure 2. Exemples d'organisation de réseaux de microtubules et d'actine dans des cellules en division, en migration, ou en différenciation. Les microtubules sont en vert, l'actine en rouge (adapté de Rodriguez et al. 2003).

Dans ce travail, je me suis focalisée sur le rôle d'une protéine régulatrice du cytosquelette, tau, dans l'organisation spatiale des microtubules et leur interaction avec l'actine. Tau est une protéine principalement neuronale initialement identifiée comme facteur de liaison aux microtubules. Tau stimule l'assemblage des microtubules, les stabilise et les organise en faisceaux dans les prolongements axonaux des neurones (Drubin et Kirschner, 1986 ; Kanai et al., 1989, Drechsel et al., 1992). Depuis sa découverte en 1975 (Weingarten et al., 1975), de nombreux autres partenaires de tau ont été mis en évidence tels que la membrane plasmique, l'ADN et diverses protéines comme des kinases (pour revue : Morris, 2011). Tau est également capable de lier le cytosquelette d'actine (Fulga et al., 2007 ; He et al., 2009), ce qui en fait un candidat potentiel régulant l'interaction microtubules/actine dans les cellules neuronales, comme cela avait été initialement suggéré dans les années 80 (Griffith et Pollard, 1982).

Dans ce contexte, le travail de ma thèse a été de comprendre les mécanismes moléculaires impliqués dans l'organisation des cytosquelettes de microtubules et d'actine par tau avec deux aspects complémentaires : 1/ caractérisation des paramètres de formation des faisceaux de microtubules par tau et détermination des domaines de tau impliqués dans ce phénomène et 2/ rôle de tau dans la coordination microtubules/actine. Du fait de la petite taille des prolongements neuronaux et de la résolution spatiale limitée des microscopies à fluorescence classique, les événements de formation de faisceaux de microtubules et d'interaction des microtubules avec les filaments d'actine ont été reconstitués *in vitro* à partir de composants purifiés, afin de pouvoir étudier précisément l'organisation et la dynamique de ces réseaux isolés.

Dans l'introduction de ce manuscrit, je débiterai par la description de la tubuline, de l'actine et de leur assemblage en microtubules ou en filaments d'actine, puis je traiterai de l'organisation et des fonctions de ces deux cytosquelettes dans le neurone, pour finir par une partie plus détaillée sur la protéine tau. Je présenterai ensuite les résultats de mes deux projets, en commençant par l'étude de l'organisation des faisceaux de microtubules par tau, et en terminant par la mise en évidence de tau comme acteur direct du lien entre microtubules et actine.

Chapitre I : Introduction

I - Structure, dynamique et organisation des microtubules et des filaments d'actine

1. Les microtubules

a) La tubuline, unité de base du microtubule

Les microtubules sont des tubes creux résultant de l'assemblage de tubuline (Amos et Klug, 1974). Leur diamètre moyen est de 25 nm et leur longueur peut varier de quelques microns à plusieurs centaines de microns. La tubuline est une protéine hétérodimérique constituée de deux sous-unités globulaires d'environ 450 acides aminés : la tubuline α et la tubuline β . Chaque sous-unité possède un site de fixation pour le nucléotide GTP : site N pour la sous-unité α et site E pour la sous-unité β . Le GTP peut être hydrolysé en GDP sur la sous-unité β , alors qu'il est non hydrolysable sur la sous-unité α . Lors de la polymérisation de la tubuline en microtubule, le site E est associé au GTP, lequel sera hydrolysé au cours de l'assemblage. Il a été montré que cette hydrolyse était nécessaire à la déstabilisation de la paroi du microtubule et donc à la dépolymérisation du microtubule, mais pas à sa polymérisation (Hyman et al., 1992 ; Caplow et al., 1994). La structure à haute résolution de la tubuline a pu être déterminée par diffraction aux électrons sur des feuilletts bidimensionnels de microtubules formés en présence de zinc et stabilisés au taxol (Nogales et al., 1998) (Figure 3).

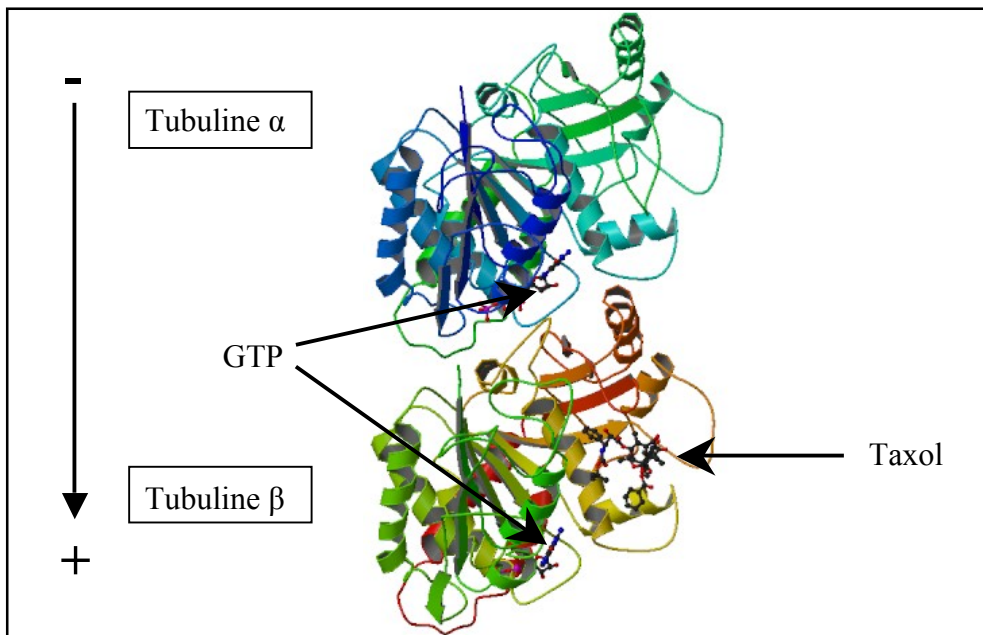


Figure 3. Représentation tridimensionnelle de la structure du dimère de tubuline.

Les deux sous-unités sont liées au GTP qui ne peut être hydrolysé que sur la sous-unité β . La tubuline β possède un site de liaison au taxol. Image extraite du logiciel de la Protein Data Bank (www.rcsb.org) selon Nogales et al. (1998).

Les deux monomères de tubuline α et β possèdent des homologies structurales quasiment superposables, avec une proportion de 39% d'hélices α , 13% de feuillets β et 48% d'autres structures (Löwe et al., 2001 ; Gigant et al., 2005). Chaque sous-unité peut être divisée en trois sous-domaines fonctionnels. Le domaine N-terminal (acides aminés 1-205) contient la région de fixation du GTP ou du GDP. Le domaine intermédiaire (206-381) contient le site de fixation au taxol et une hélice α qui participe à l'interaction longitudinale entre les monomères. Le domaine C-terminal contient deux hélices α et une extrémité riche en acides glutamiques qui se retrouvent exposés sur la face externe du microtubule et qui seraient impliqués dans la liaison avec des protéines associées aux microtubules (MAPs, pour Microtubule-Associated Proteins). Cette extrémité C-terminale est sujette à de nombreuses modifications post-traductionnelles (phosphorylation, polyglutamylation, détyrosination) qui seraient impliquées dans la fixation différentielle des MAPs à la surface des microtubules (Peris et al., 2006 ; pour revue : Janke et Bulinski, 2011).

b) Structure des microtubules

Les microtubules sont des polymères cylindriques dont la paroi est constituée de l'association latérale de protofilaments, eux-mêmes composés de l'arrangement séquentiel non-covalent d'hétérodimères de tubuline (Amos et Klug, 1974) (Figure 4A). Ces dimères ont une structure polarisée, conférant ainsi une polarité au microtubule. L'extrémité (+) expose les sous-unités β et l'extrémité (-) les sous-unités α (Hirose et al., 1995 ; Fan et al., 1996). Cette polarité structurale induit une cinétique de polymérisation différente entre les deux extrémités du microtubule, caractérisée par une croissance plus rapide de l'extrémité (+) par rapport à l'extrémité (-). La structure du microtubule a pu être obtenue à une résolution de 8 Å par cryo-microscopie électronique (cryo-ME) et sa superposition avec la structure atomique de la tubuline a permis de définir précisément les interactions moléculaires mises en jeu dans la paroi du polymère (Li et al., 2002) (Figure 4B et C). L'observation par cryo-ME des extrémités de microtubules en cours d'assemblage a également montré que leur croissance se fait par l'extension de protofilaments arrangés en feuillets courbes, plus ou moins longs suivant la quantité de tubuline-GTP disponible (voir ci-dessous, Figure 7B). Ce feuillet résulte de l'association latérale des protofilaments. Il va par la suite se refermer naturellement au niveau de la jointure du microtubule pour former un tube de 25 nm de diamètre (Chrétien et al., 1995).

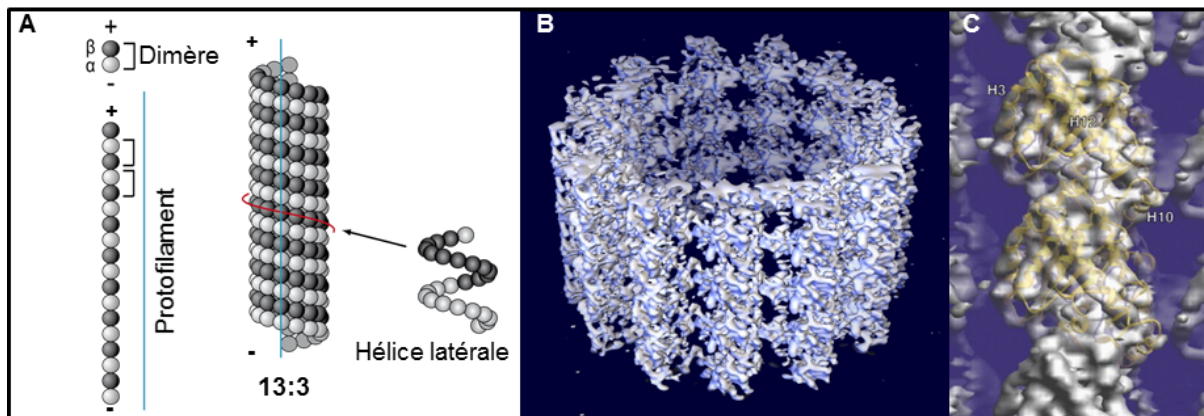


Figure 4. Organisation de la structure d'un microtubule. (A) Gauche : Protofilament assemblé à partir de dimères de tubuline. L'association latérale des protofilaments forme un feuillet dont la fermeture induit un tube de 25 nm de diamètre. Droite : Organisation du réseau de surface d'un microtubule type à 13 protofilaments et 3 hélices latérales. Les protofilaments sont parallèles à l'axe longitudinal du microtubule. (B) Structure à haute résolution (8 Å) d'un microtubule avec l'extrémité (+) vers le haut. (C) Superposition de la structure à haute résolution d'un microtubule avec la structure atomique d'un dimère de tubuline (d'après Li et al. 2002).

In vitro, on observe un nombre variable de protofilaments par microtubule (de 9 à 17) (Chrétien et Wade, 1991). *In vivo*, les microtubules sont majoritairement composés de 13 protofilaments (Tilney et al., 1973 ; Evans et al., 1985). Des analyses structurales par cryo-ME ont montré que dans cette configuration, les protofilaments sont orientés parallèlement à l'axe longitudinal du microtubule. Chaque protofilament est décalé longitudinalement par rapport à son voisin, de telle sorte que les monomères de tubuline décrivent des hélices latérales à la surface du microtubule (Figure 4A). Trois hélices latérales sont nécessaires pour remplir entièrement la paroi du microtubule. On parle de microtubule 13:3. Si le microtubule possède un nombre de protofilaments différent de 13, il apparaît une discontinuité physique entre les sous-unités voisines de tubuline, discontinuité qui est corrigée par un vrillage des protofilaments (Wade et al., 1990). Cette adaptation du réseau de surface permet au microtubule de conserver sa symétrie hélicoïdale et peut également s'accompagner d'une variation du nombre d'hélices latérales en fonction du nombre de protofilaments (par exemple il y a 2 hélices latérales pour un nombre de protofilaments inférieur à 12, et 4 pour un nombre de protofilaments supérieur à 16). La valeur de l'angle de vrillage des protofilaments est faible et ne peut dépasser 2 degrés, mais est suffisante pour induire un stress mécanique dans la paroi du microtubule (Chrétien et Fuller, 2000 ; Hunyadi et al., 2005). Il est à noter que le nombre de protofilaments peut également varier au sein d'un même microtubule et provoquer l'apparition de défauts (Chrétien et al., 1992). Ces défauts pourraient déstabiliser les microtubules et/ou être à l'origine de variation de leur propriétés mécaniques en augmentant

leur flexibilité (Hunyadi et al., 2005 ; Portran et al., 2013 ; Schaedel et al., 2015). Les microtubules à 13 protofilaments et 3 hélices latérales seraient privilégiés dans la nature en raison de l'absence de vrillage des protofilaments, ce qui en ferait des structures énergétiquement plus stables que les autres types de microtubules (Chrétien et Fuller 2000 ; Hunyadi et al. 2005).

La majorité des microtubules observés *in vitro* et *in vivo* adopte un réseau de surface dimérique de type B, ce qui signifie que les hélices latérales sont constituées exclusivement de sous-unité α ou β (Kikkawa et al., 1994 ; Song et Mandelkow, 1993 et 1995). Dans ce cas, une jonction entre une sous-unité α et une sous-unité β apparaît à chaque tour d'hélice pour les microtubules organisés sur un nombre impair d'hélices latérales (pour les microtubules de type 13:3, voir Figure 4A) (pour revue : Wade et Hyman, 1997). Cette jonction a été visualisée *in vivo* et *in vitro* (Kikkawa et al., 1994 ; Metoz et al., 1997 ; Sosa et Milligan, 1996). Elle pourrait correspondre à la zone de fermeture des feuillets bidimensionnels de tubuline présents lors de la croissance du microtubule.

c) Le microtubule, un polymère dynamique

i. La nucléation et l'élongation

In vivo, la nucléation des microtubules est dépendante de l'activité d'un complexe protéique en forme d'anneaux, nommé γ -TuRC, composé de γ -tubuline et de protéines associées. Ce complexe définit le bout (-) des microtubules et permet l'élongation de leur bout (+). Dans la plupart des types cellulaires, il est localisé au centrosome. Ce dernier est composé de deux centrioles, eux-mêmes constitués généralement de 9 triplets de microtubules. C'est dans l'espace péricentriolaire que se trouve la majorité de la γ -tubuline (Stearns et Kirschner, 1994) (Figure 5). Un des modèles d'élongation de la tubuline à partir des anneaux de γ -tubuline suggère une croissance hélicoïdale (Zheng et al., 1995 ; Moritz et al., 2000 ; Job et al., 2003). Une autre hypothèse propose la formation d'un feuillet bidimensionnel à partir du γ -TuRC déroulé, feuillet qui se refermerait ensuite en tube (Erickson et al., 1996 ; Job et al., 2003). Le centrosome est généralement localisé près du noyau. Les microtubules s'organisent donc de façon radiale du centre de la cellule vers sa périphérie, occupant ainsi l'ensemble de l'espace cellulaire. Cette disposition favorise notamment le transport des vésicules dans toute la cellule (pour revue, voir Job et al., 2003).

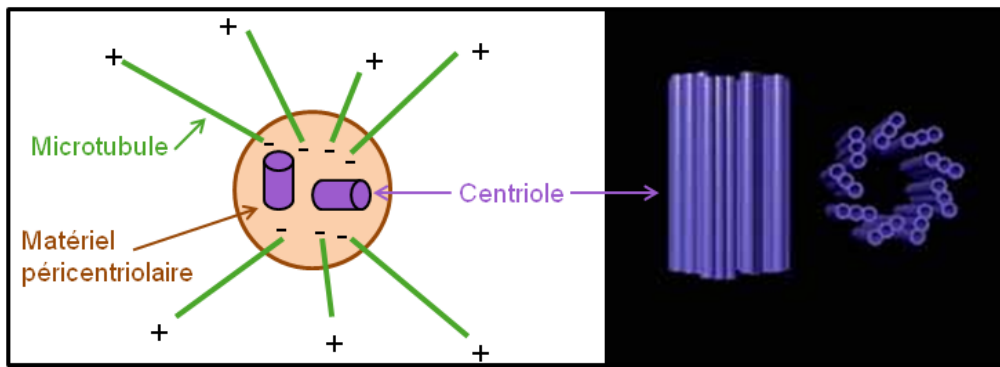


Figure 5. Organisation d'un centrosome et d'un centriole. A gauche, schéma d'un centrosome avec les microtubules irradiant dans le cytoplasme. A droite, représentation tridimensionnelle de deux centrioles, composé chacun de 9 triplets de microtubules (Source : www.snv.jussieu.fr).

In vitro, la tubuline est capable de s'auto-assembler à partir de tubuline purifiée sous certaines conditions : sa concentration doit être supérieure à une concentration dite « critique », il faut du GTP, du magnésium, un pH proche de 7 et une température autour de 35°C. La cinétique d'assemblage d'une population de microtubules à une concentration donnée est caractérisée par trois phases : une phase de nucléation, une phase d'élongation et une phase stationnaire qui correspond à un équilibre entre la polymérisation et la dépolymérisation des microtubules, atteint lorsque la concentration en tubuline libre est égale à la concentration critique. Pour initier l'assemblage d'un microtubule, la tubuline forme d'abord des noyaux de nucléation qui servent de base à l'élongation du tube. Deux modèles ont été proposés pour expliquer les mécanismes de nucléation et d'élongation de microtubules auto-assemblés. Dans le premier modèle, les dimères de tubuline s'associent longitudinalement pour former des oligomères correspondant à des courts protofilaments (Flyvbjerg et al., 1996). Une fois 7 à 13 dimères de tubuline alignés, un feuillet se forme par l'ajout latéral et longitudinal de dimères puis se ferme pour former le microtubule (Figure 6A). Dans le second modèle, il y a formation d'un pool d'oligomères de tubuline formés par l'association latérale de dimères. Ces oligomères constituent un noyau actif sur lequel vont se rajouter d'autres dimères de tubuline, pour aboutir à un feuillet qui conduira à la formation d'un microtubule (Caudron et al., 2002 ; Job et al., 2003) (Figure 6B).

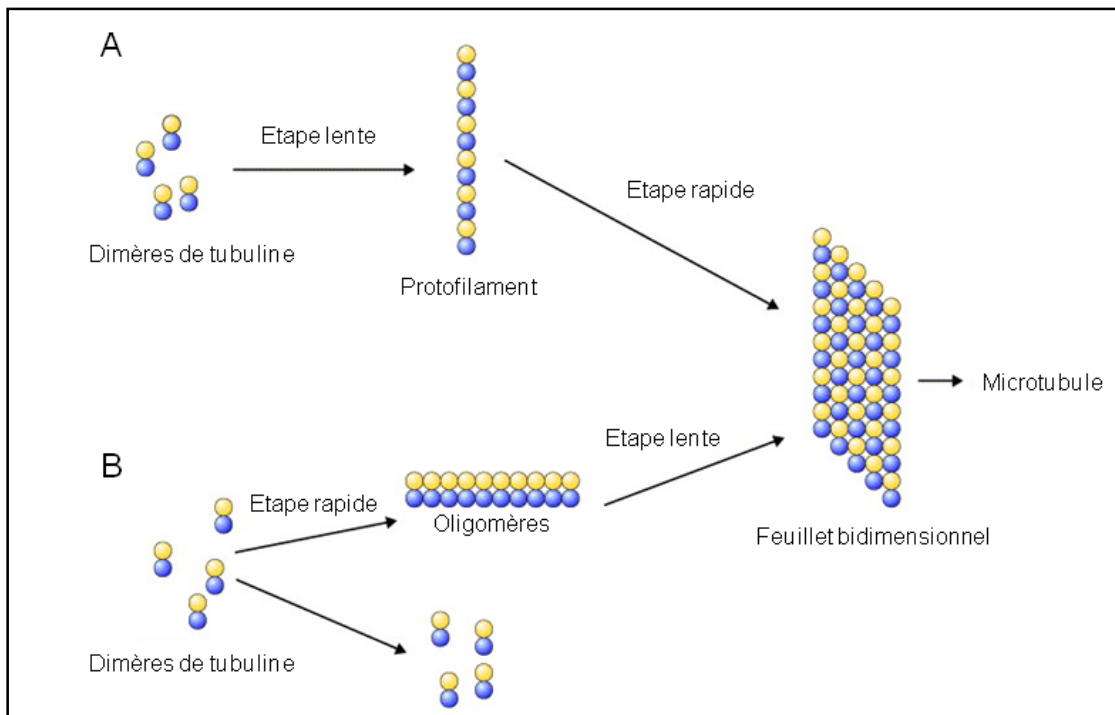


Figure 6. Deux modèles expliquant la nucléation des microtubules *in vitro*. Les microtubules se forment à partir d'un noyau de nucléation sous forme de protofilaments (A) ou sous forme d'oligomères (B). Dans les deux cas, ces noyaux de nucléation sont à l'origine de la formation d'un feuillet bidimensionnel de tubuline (d'après Job et al., 2003).

Les microtubules vont ensuite polymériser par addition à leurs extrémités d'hétérodimères de tubuline associés au GTP. Au cours de cette étape, la molécule de GTP associée à la tubuline β est hydrolysée (Hyman et al., 1992). La vitesse de polymérisation est environ deux fois plus rapide à l'extrémité (+) qu'à l'extrémité (-) et dépend de la concentration libre de tubuline-GTP (Walker et al., 1988).

ii. L'instabilité dynamique

L'instabilité dynamique des microtubules a été mise en évidence en 1984 par Mitchison et Kirschner qui montrent qu'à l'état stationnaire, c'est-à-dire quand la concentration en tubuline libre reste constante dans le milieu, la longueur moyenne des microtubules fluctue fortement (Mitchison et Kirschner, 1984a et b). Ils font l'hypothèse que les microtubules alternent de façon aléatoire entre des phases de polymérisation et de dépolymérisation. Ce phénomène d'instabilité dynamique a été par la suite confirmé en vidéo-microscopie optique *in vitro* et dans les cellules (Horio et Hotani, 1986 ; Sammak et Borisy, 1988 ; Walker et al., 1988). Lors du désassemblage, les protofilaments deviennent courbes à l'extrémité du microtubule en dépolymérisation. On dit qu'ils prennent un aspect de « peau de

banane » (Figure 7B). Des dimères de tubuline sont alors libérés. Cette dépolymérisation peut être provoquée par différents facteurs : une dilution de la tubuline, une exposition au froid, un ajout de calcium, ou une exposition à des drogues comme la colchicine ou le nocodazole.

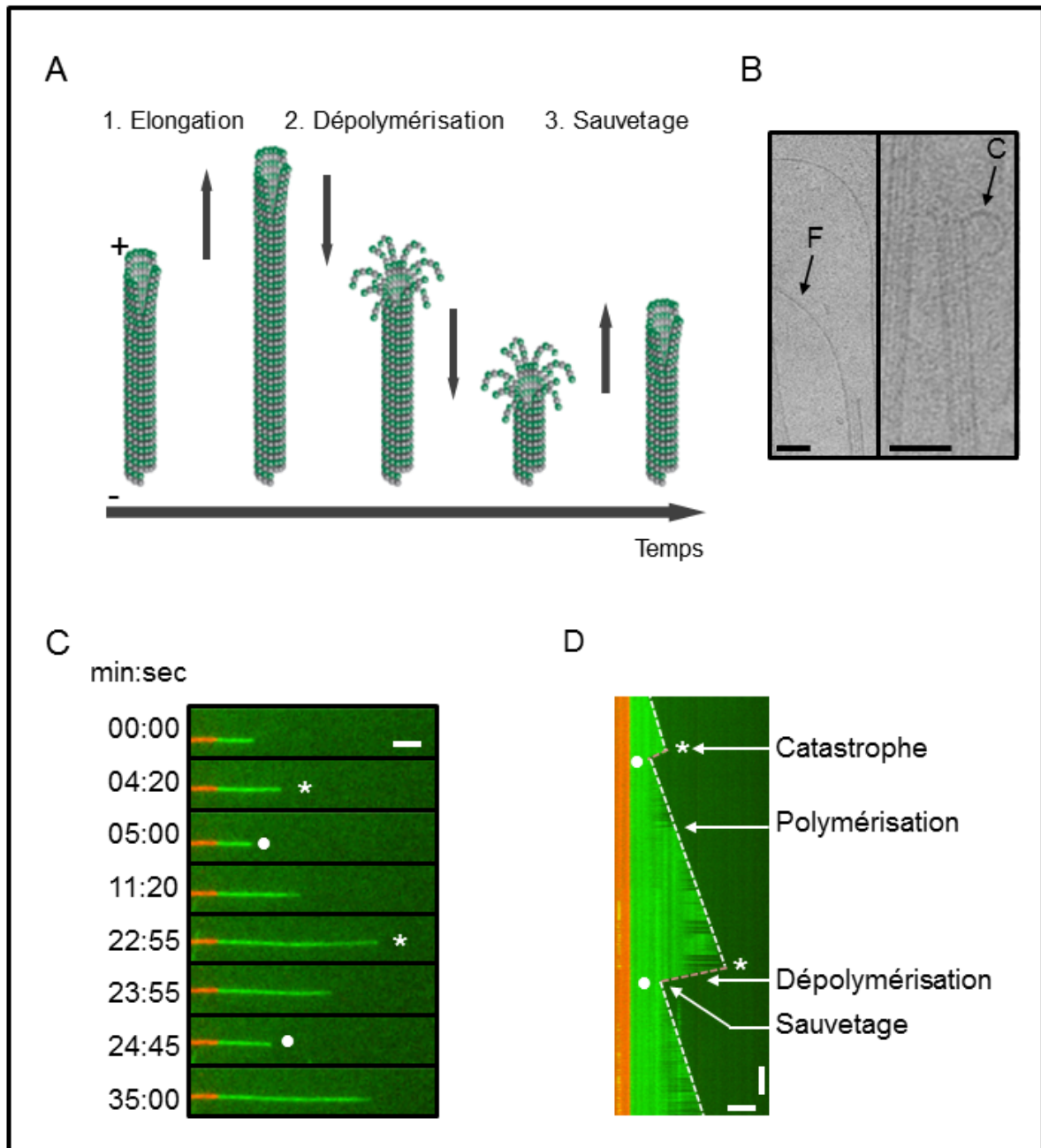


Figure 7. Les microtubules sont dynamiquement instables. (A) Schéma représentant un microtubule polymérisant (1) à son extrémité (+), puis dépolymérisant (2) via une catastrophe, puis repolymérisant après l'arrêt de la dépolymérisation (3) via un sauvetage (adapté de Alberts et al., 1994). (B) Feuillet « F » à l'extrémité d'un microtubule en polymérisation (gauche) et protofilament courbe « C » à l'extrémité d'un microtubule en dépolymérisation (droite). Barre d'échelle : 50 nm (tiré de Chrétien et al., 1995). (C) Séquence d'images montrant les différentes phases de dynamique du microtubule. Le microtubule vert pousse à partir d'une amorce stable rouge de GMPCPP. Les étoiles correspondent à des catastrophes et les ronds à des sauvetages. (D) Kymographe représentant l'histoire du bout (+) du microtubule en (C). Barre verticale : 3 min, barre horizontale : 5 μ m.

L'instabilité dynamique est une propriété intrinsèque des microtubules qui se manifeste donc par l'alternance aléatoire entre une phase de polymérisation et une phase de dépolymérisation. Le passage de la phase de polymérisation à la phase de dépolymérisation est appelée catastrophe et l'évènement inverse un sauvetage (Figure 7). On peut décrire l'instabilité dynamique par 4 paramètres : la vitesse de polymérisation, la vitesse de dépolymérisation, la fréquence de catastrophes et la fréquence de sauvetages. Ses paramètres sont différents entre les extrémités (+) et (-) du microtubule (Walker et al., 1988). Les facteurs précis dont dépend ce comportement d'instabilité dynamique sont encore mal connus. L'étude de Walker et al. en 1988 a mis en évidence que la concentration en tubuline libre influe sur la dynamique des microtubules : la vitesse d'élongation aux deux extrémités augmente avec la concentration en tubuline ; à l'inverse, la fréquence de catastrophes diminue lorsque cette concentration augmente. D'autre part, on sait que l'instabilité dynamique nécessite de l'énergie apportée par l'hydrolyse du GTP sur la tubuline β lors de l'incorporation du dimère dans la paroi du microtubule (David-Pfeuty et al., 1977 ; Carlier et Pantaloni, 1981). Il a été montré, à l'aide d'analogues du GTP non hydrolysables, que l'hydrolyse du GTP n'est pas nécessaire à l'assemblage du microtubule mais qu'elle est impliquée dans la déstabilisation de la paroi du microtubule et la survenue des catastrophes (Hyman et al., 1992 ; Caplow et al., 1994). En effet, l'hydrolyse du GTP entraînerait un changement conformationnel des sous-unités et un affaiblissement des interactions entre protofilaments, favorisant la dépolymérisation (Figure 8).

L'un des modèles permettant d'expliquer l'instabilité dynamique des microtubules est justement basé sur l'existence de deux états conformationnels différents de la tubuline : un état GDP instable constituant la majorité du microtubule dans lequel la tubuline est courbe (Hyman et al., 1995 ; Wang et Nogales, 2005), et un état GTP stable adoptant une conformation droite favorable aux interactions entre dimères de tubuline (Figure 8). C'est le modèle de la coiffe GTP (Mitchison et Kirschner, 1984 ; Carlier et Pantaloni, 1981). Dans des conditions d'assemblage, il y aurait un délai entre l'insertion de la tubuline-GTP et son hydrolyse, durant lequel la coiffe de tubuline-GTP maintiendrait le microtubule en croissance en stabilisant son extrémité. La perte de cette coiffe entraînerait les catastrophes, faisant ainsi adopter aux protofilaments leur conformation GDP courbe. La taille de la coiffe de tubuline-GTP a été estimée à quelques dimères de tubuline *in vitro* et jusqu'à 750 molécules de tubuline *in vivo* (Schek et al., 2007 ; Seetapun et al., 2012). Ce modèle a été renforcé par l'étude à haute résolution du microtubule dans différents états nucléotidiques à l'aide

d'analogues non hydrolysables du GTP qui montre une compaction globale de la tubuline suite à l'hydrolyse du GTP, déstabilisant les interactions au sein du microtubule (Alushin et al., 2014 ; Zhang et al., 2015).

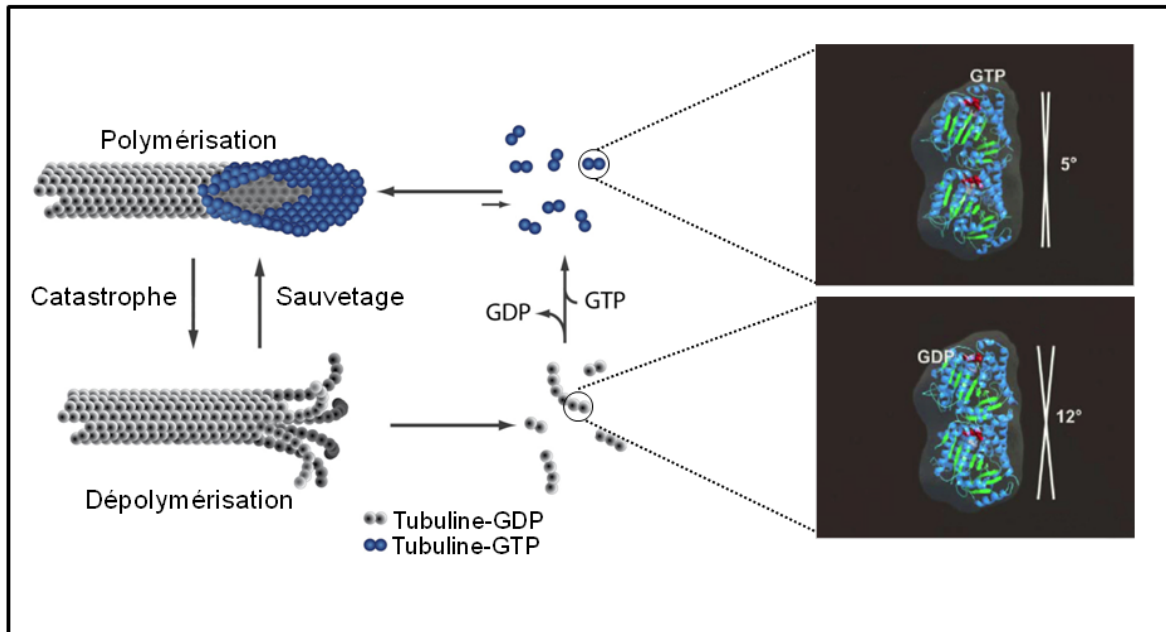


Figure 8. Modèle de la coiffe GTP. La coiffe de tubuline-GTP à l'extrémité (+) du microtubule protège le polymère de la dépolymérisation. La tubuline-GDP est dans une conformation plus courbée (12°) que la tubuline-GTP (5°), d'où, après hydrolyse du GTP, une déstabilisation des interactions entre protofilaments (d'après Wang et Nogales, 2005).

Parallèlement à ce modèle de coiffe GTP, un autre concept a émergé pour expliquer les mécanismes de l'instabilité dynamique des microtubules : celui de la coiffe conformationnelle (Chrétien et al., 1995 et 1999) (Figure 9). Dans ce modèle, la courbure intrinsèque des protofilaments vers l'extérieur du microtubule s'oppose à la courbure latérale résultant de leur association. Cette force latérale contraint à la fois le tube à se refermer et les protofilaments à se redresser progressivement, ce qui induit une accumulation d'énergie dans la paroi du microtubule. Le feuillet courbe à l'extrémité en croissance (Figure 9) subit moins de tensions que le tube puisqu'il permet aux protofilaments de garder partiellement leur configuration courbe native. Ainsi, le feuillet représenterait une coiffe conformationnelle stabilisant le microtubule dans un état de croissance et dont la disparition induirait les catastrophes (Chrétien et al., 1995 ; Arnal et al., 2000). Selon un modèle récent, la fermeture du feuillet sur des défauts (comme un changement du nombre de protofilaments) pourrait être un des mécanismes à l'origine des catastrophes (Chrétien et Fuller, 2000 ; Hunyadi et al., 2005 ; Vitre et al., 2008).

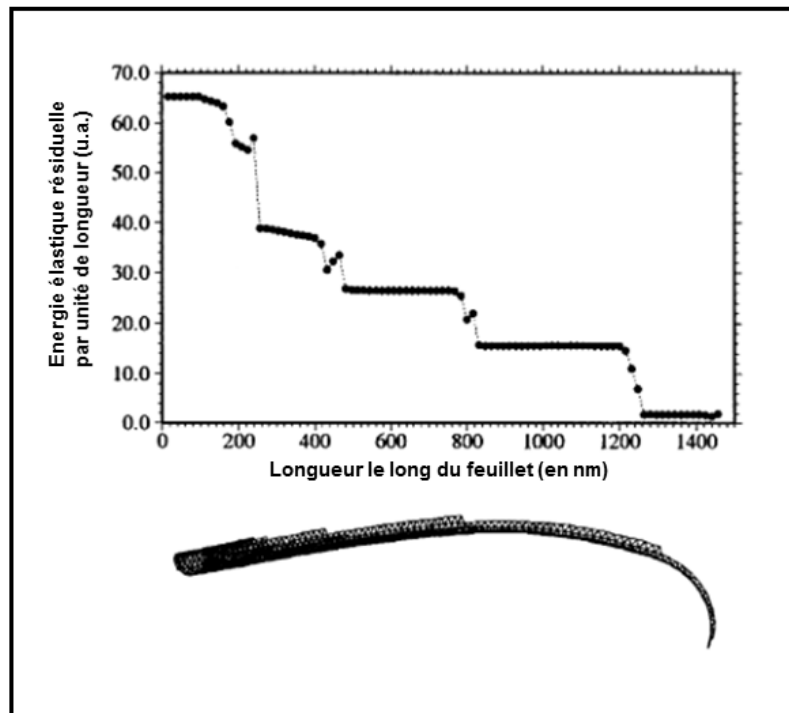


Figure 9. Modélisation des tensions accumulées le long d'un microtubule en croissance. Tiré de János et al., 1998.

D'autres résultats par diffraction aux rayons X et modélisation moléculaire ont montré que les dimères de tubuline associés au GTP ou au GDP en solution ont une structure courbe identique, et que seule l'action mécanique de la fermeture du feuillet en tube induirait des changements conformationnels de la tubuline, c'est-à-dire le passage d'une conformation courbe à droite (Buey et al., 2006 ; Gebremichael et al., 2008 ; Rice et al., 2008). L'hydrolyse du GTP, qui pourrait résulter du redressement mécanique des feuillets (Chrétien et al., 1999), modulerait alors la force des interactions entre protofilaments.

A l'inverse des catastrophes, les événements de sauvetage de microtubules polymérisés uniquement à partir de tubuline purifiée sont très rares, mais sont amplifiés en présence de certaines MAPs (Arnal et al., 2004 ; Vitre et al., 2008). Le mécanisme moléculaire à l'origine des sauvetages reste mal connu mais pourrait impliquer des petits îlots de tubuline-GTP non hydrolysé subsistant dans la paroi du microtubule après fermeture du feuillet (Dimitrov et al., 2008). Durant leur étude, Walker et al (1988) ont également décrit des événements de pause dans la dynamique du microtubule, sans élongation ni raccourcissement. Ce comportement semble rare *in vitro* mais on le retrouve plus fréquemment et sur de plus longues périodes *in vivo* (Schulze et Kirschner, 1988).

In vivo, l'instabilité des microtubules est impliquée notamment dans le phénomène de « recherche et capture » qui permet l'exploration rapide par les microtubules d'un certain volume de la cellule dans le but d'y trouver une cible. Ce système est utilisé par exemple pour l'ancrage des chromosomes au fuseau mitotique au cours de la division cellulaire (Mitchison et Kirschner, 1985). Plus généralement, l'instabilité dynamique des microtubules favorise l'organisation et le remodelage rapide du réseau microtubulaire en fonction de l'état de la cellule. La régulation spatiale et temporelle de cette dynamique est donc importante afin d'en faire un mécanisme contrôlé et non aléatoire comme il est caractérisé intrinsèquement.

d) L'organisation spatiale des microtubules *in vivo*

Dans les cellules, les microtubules agissent souvent en coopération avec d'autres microtubules voisins. Ils adoptent ainsi une organisation particulière, sous forme de réseaux, qui diffère suivant l'état ou le type cellulaire. Il existe deux grands types de configuration de réseaux de microtubules : centrosomale et acentrosomale. Un réseau de microtubules issu d'un centrosome est radial. Cette architecture, si elle intervient dans la migration cellulaire et le positionnement de diverses organelles (Cole et Lippincott-Schultz, 1995), ne permet pas à la cellule d'acquiescer des fonctions ou des formes nouvelles. Certaines cellules possèdent les deux types de réseaux, comme les cellules du tissu épithélial (Figure 10A). Leurs microtubules acentrosomaux sont impliqués dans le transport vectorisé et polarisé de composants membranaires afin de maintenir ou de réorganiser l'importante surface des microvillosités de ces cellules. Les neurones ont quant à eux développé des réseaux de microtubules qui se chevauchent en faisceaux parallèles ou anti-parallèles, et qui permettent à l'axone de se différencier et de parcourir de longues distances. Cette organisation particulière des microtubules dans les neurones sera détaillée dans la partie II de cette introduction. Ainsi, le développement de réseaux de microtubules acentrosomaux permet aux cellules de mettre en place une plus grande diversité d'activités spécialisées.

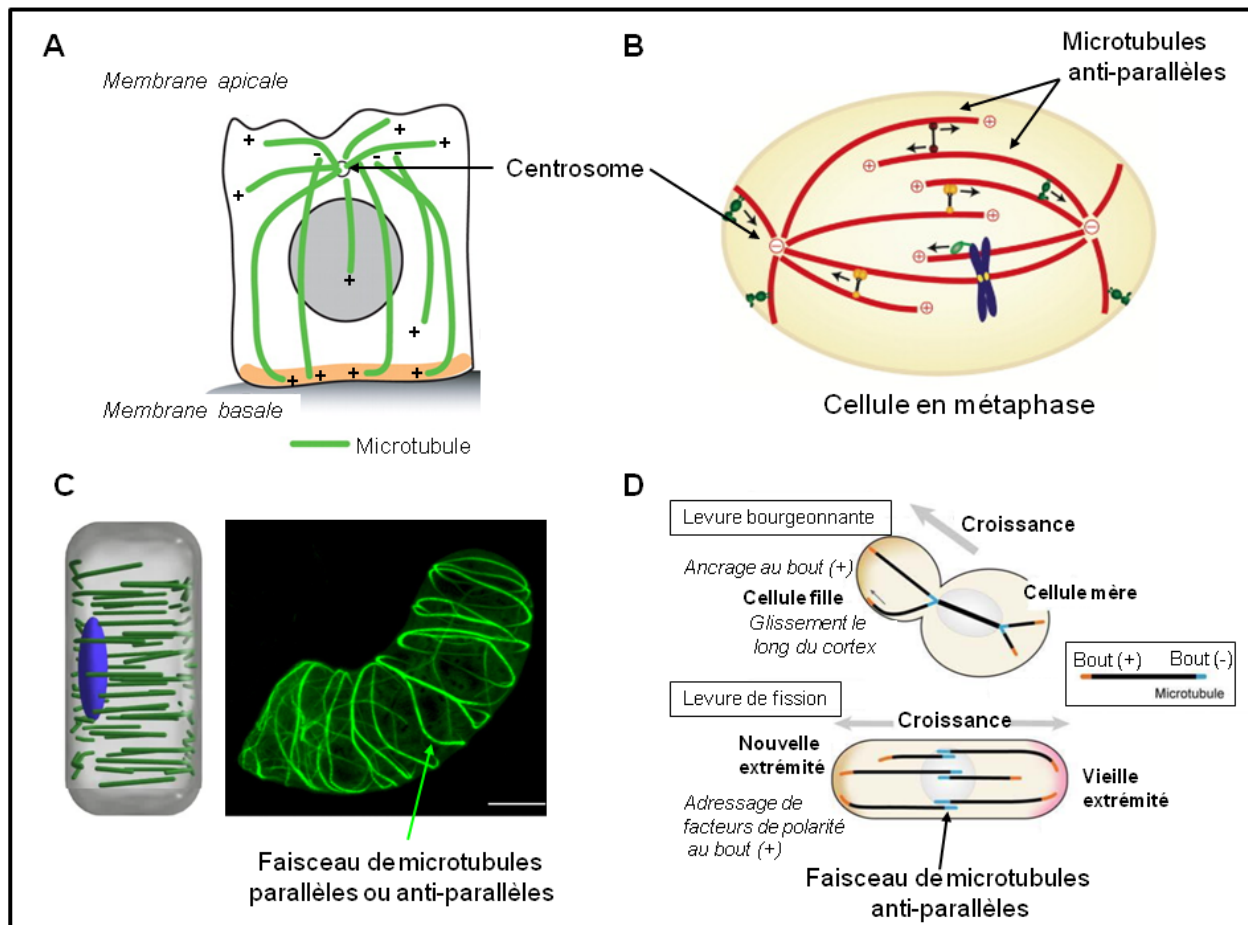


Figure 10. Organisation du réseau de microtubules dans différents types cellulaires. (A) Les cellules épithéliales contiennent des microtubules centrosomiaux et acentrosomiaux (d'après Hotta et al., 2010). (B) Dans le fuseau mitotique, le glissement des microtubules anti-parallèles les uns par rapport aux autres est régulé par différentes MAPs et permet d'exercer des forces sur les deux pôles pour séparer équitablement les chromatides entre les cellules filles (d'après Gadde et Heald, 2004). (C) Dans la cellule de plante, les faisceaux de microtubules de polarité mixte se trouvent à proximité de la membrane plasmique et sont perpendiculaires à l'axe de croissance de la cellule. Barre d'échelle : 8 μm (d'après Mao et al., 2006). (D) Chez la levure de fission, les microtubules s'organisent de façon anti-parallèle au centre de la cellule (d'après Mimori-Kiyosue, 2011).

Un exemple de réseau centrosomal est le fuseau mitotique qui se forme durant la mitose (Figure 10B). Les microtubules qui irradient à partir du centrosome vont s'intercaler pour former un réseau de microtubules anti-parallèles dans la zone centrale du fuseau, appelée « midzone ». La midzone joue un rôle crucial dans la séparation correcte des chromosomes, en établissant la bipolarité du fuseau mitotique par la connexion des deux pôles (asters) et en maintenant la stabilité du fuseau mitotique au cours de la mitose. L'organisation des microtubules en faisceaux et leur glissement les uns par rapport aux autres permet au fuseau mitotique de s'allonger au cours de l'anaphase et d'exercer des forces mécaniques pour écarter les deux pôles l'un de l'autre. De nombreuses protéines associées aux microtubules

permettent ces associations latérales entre microtubules et régulent la structure et la longueur de la midzone (pour revue : Goshima et Scholey, 2010).

Contrairement aux cellules animales, les plantes ne possèdent pas de centre organisateur de microtubules comme le centrosome. En interphase, les microtubules sont dispersés dans le cortex cellulaire (Wasteney, 2002). L'expansion de la cellule ne se fait pas par la déformation directe de la membrane par le cytosquelette mais par extension de la paroi cellulaire. En effet, le réseau de microtubules corticaux influence indirectement l'orientation des nouvelles fibres de cellulose dont le complexe de synthèse est situé au niveau de la membrane plasmique (pour revue : Baskin, 2001). Les microtubules corticaux sont organisés en faisceaux distribués majoritairement de façon perpendiculaire à l'axe d'élongation de la cellule (Figure 10C). Au sein de ces faisceaux, la polarité des microtubules est mixte (Van Damme et al., 2004 ; Lucas et Shaw, 2011). Le co-alignement de microtubules pour former des réseaux de faisceaux a pu être observé dans les cellules de plantes (Wasteney et Ambrose, 2009) car il est possible d'observer directement la dynamique des microtubules dans ces tissus. Dans les cellules de plante, l'interaction microtubule-microtubule et microtubule-cortex est donc cruciale pour la mise en place d'une auto-organisation stable du réseau de microtubules. Elle fait intervenir différentes MAPs, chacune spécialisée dans une fonction particulière permettant l'organisation et la modulation du réseau de microtubules : elles contribuent à la mise en place des faisceaux, ou à la régulation de la dynamique des microtubules, ou à leur interaction avec le cortex cellulaire.

Chez la levure, les microtubules sont également acentrosomaux. Cet organisme unicellulaire ne possède que quelques microtubules parallèles à son axe de croissance. Chez les levures de fission, comme *Schizosaccharomyces pombe*, les microtubules sont organisés en 3 à 6 faisceaux composés chacun de 2 à 9 microtubules de polarité opposée (Höög et al., 2007). Les extrémités (+) des microtubules sont dirigées vers les bords de la cellule et leur extrémité (-), qui correspond à la zone d'interdigitation, vers la surface du noyau (Figure 10D). Le réseau de microtubules en interphase assure entre autres le maintien de la polarité de la cellule et le positionnement central du noyau. En effet, les microtubules permettent d'amener, via des moteurs moléculaires, des facteurs de polarisation aux extrémités de la cellule, qui peuvent alors recruter des complexes de protéines impliqués dans l'assemblage de l'actine (Mimori-Kiyosue, 2011). L'axe de division de la levure de fission se situe au centre de la cellule, alors que chez la levure de bourgeonnement, l'axe de division est déterminé par

l'émergence du bourgeon. Dans les levures, les protéines associées aux microtubules jouent un rôle important dans les interactions entre microtubules au centre de la cellule, dans l'ancrage des microtubules à la membrane permettant l'application d'une force mécanique nécessaire à la croissance de la levure, et dans l'acheminement de protéines spécifiques à la membrane.

Ces quelques exemples montrent que les cellules eucaryotes possèdent une grande diversité de réseaux de microtubules, et leurs organisations particulières, centrosomales ou acentrosomales, soulignent leurs implications essentielles dans la morphogenèse cellulaire. Les réseaux de microtubules peuvent aussi s'associer à des réseaux constitués d'autres éléments du cytosquelette, comme les filaments d'actine, pour former des réseaux mixtes. Le rôle et la régulation des interactions entre les cytosquelettes de microtubules et d'actine seront caractérisés dans le neurone, dans la partie II de cette introduction.

L'instabilité dynamique et l'organisation spatiale des microtubules en réseaux sont donc régulées dans les cellules par différentes protéines, dont les MAPs, qui s'associent directement avec les microtubules.

e) Les MAPs : facteurs de régulation de l'instabilité dynamique et de l'organisation des microtubules

Lors de la purification de préparations enrichies en microtubules réalisées à partir d'extraits de cerveaux, et après plusieurs cycles de polymérisation/dép polymérisation des microtubules, une fraction protéique reste associée aux microtubules polymérisés (Sloboda et al., 1976 ; Olmsted, 1986). On obtient ainsi des préparations contenant environ 60% de tubuline et 40% de protéines liées aux microtubules : ce sont les MAPs (Microtubule-Associated Proteins). Elles sont capables de moduler les propriétés dynamiques des microtubules ainsi que leur organisation en structures complexes. Ces protéines peuvent être divisées en quatre groupes : les MAPs dites structurales qui se fixent à la paroi du microtubule, les « +TIPs » qui se fixent au bout (+) des microtubules, les facteurs de catastrophes qui favorisent le désassemblage des microtubules, et les protéines motrices qui ont un rôle principalement dans le trafic intracellulaire et la division cellulaire.

i. Les MAPs structurales

Les MAPs structurales ou stabilisatrices sont principalement neuronales et ont été les premières MAP identifiées comme régulatrices de la dynamique des microtubules (pour revue : Cassimeris et Spittle, 2001 ; Amos et Schlieper, 2005). Elles se lient le long de la paroi du microtubule qu'elles stabilisent en affectant au moins un des quatre paramètres de l'instabilité dynamique. Chez les Vertébrés, on peut les classer en familles de protéines : les protéines MAP1, MAP2 et la protéine tau (voir ci-dessous). D'autres MAPs, que je ne décrirai pas en détails ici, ont été identifiées par la suite, comme les protéines MAP6 et la doublecortine.

Chez la plupart des Vertébrés, les protéines MAP1 sont au nombre de 3 : MAP1A (380 kDa), MAP1B (330 kDa) et MAP1S (120 kDa). Elles sont codées par des gènes distincts. Chaque protéine de cette famille est synthétisée sous la forme d'un précurseur polypeptidique qui est ensuite clivé en une chaîne lourde et une chaîne légère (Figure 11A). Les deux chaînes des protéines MAP1A et MAP1B sont pourvues d'un domaine de liaison aux microtubules. Leur chaîne légère contient en plus un domaine de liaison à l'actine. La protéine MAP1S ne contient qu'un domaine de liaison aux microtubules dans sa chaîne légère. Les protéines MAP1A et MAP1B sont capables de promouvoir l'assemblage des microtubules et de les stabiliser, notamment lors de leur exposition à des drogues dépolymérisantes comme le nocodazole (Bondallaz et al., 2006). Elles peuvent également se lier à l'actine (Tögel et al., 1998 ; Noiges et al., 2002) (Figure 11C) et organiser les filaments d'actine en faisceaux (Pedrotti, et Islam, 1994). Seule la chaîne légère de MAP1S est capable de se lier aux microtubules et de les stabiliser, et de se lier à l'actine et d'en faire des faisceaux. La chaîne lourde aurait un rôle régulateur sur la chaîne légère (Orban-Nemeth et al., 2005).

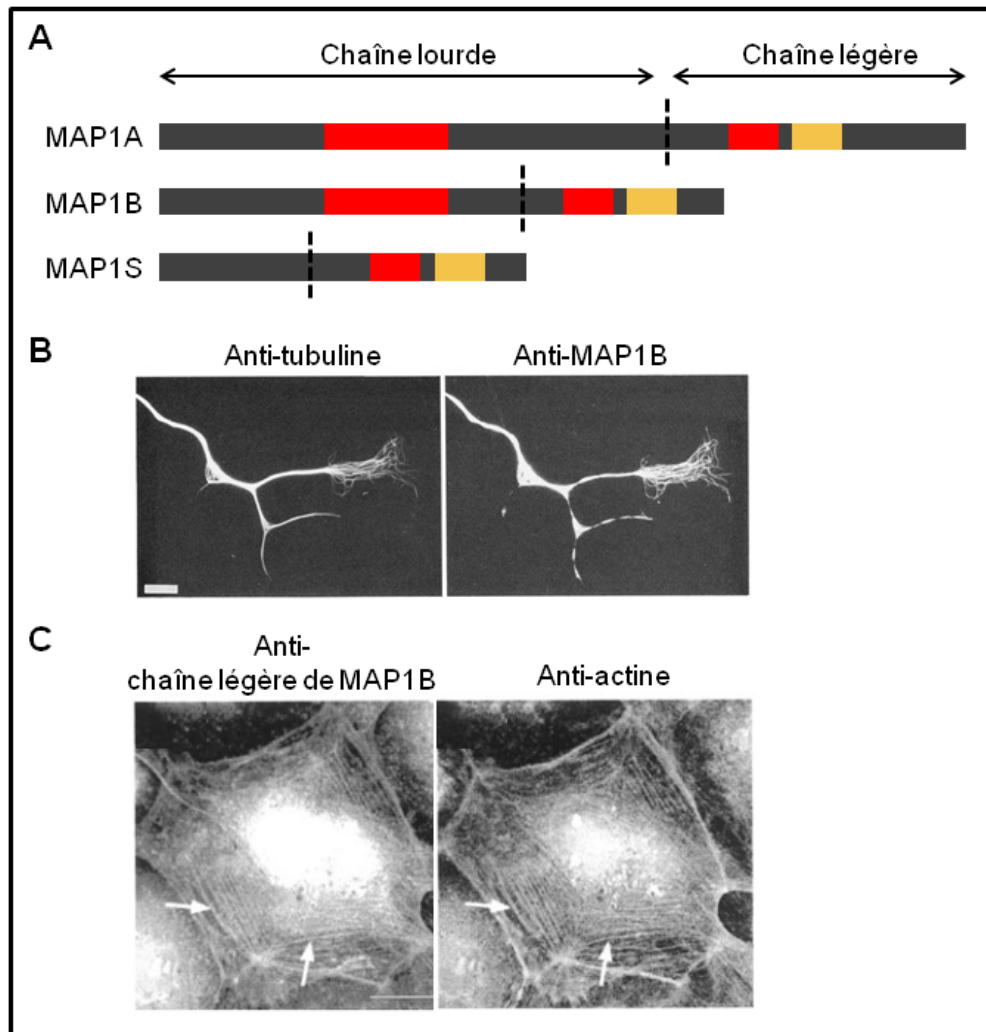


Figure 11. Structure et fonctions des protéines MAP1. (A) Représentation schématique des protéines MAP1. Ces protéines lient à la fois l'actine et les microtubules. En rouge : domaine de liaison aux microtubules, en jaune : domaine de liaison à l'actine. En pointillés noirs : site de clivage entre la chaîne lourde et la chaîne légère. (B) MAP1B co-localise avec les microtubules au niveau du cône de croissance de neurones en culture. Barre d'échelle : 5,9 μm (tiré de Black et al., 1994). (C) La chaîne légère de MAP1B interagit avec les fibres de stress d'actine dans les cellules PtK2. Barre d'échelle : 10 μm (d'après Noiges et al., 2002).

L'expression des différentes MAP1 est fortement régulée au cours du développement. MAP1B est exprimée majoritairement au stade précoce du développement neuronal, puis son expression diminue chez l'adulte. Le profil d'expression de MAP1A est l'inverse de celui de MAP1B (Tucker et al., 1989 ; Schoenfeld et al., 1989). La particularité de MAP1S est son expression plus ubiquitaire que MAP1A et MAP1B, avec des niveaux d'expression plus élevés au niveau du cerveau, des testicules, du cœur, des poumons et des reins (Orban-Nemeth et al., 2005). Elle est exprimée principalement chez l'adulte. La protéine MAP1B est présente dans tous les compartiments neuronaux, mais avec une

localisation prépondérante dans l'axone et le cône de croissance au cours du développement (Black et al., 1994) (Figure 11B). Les neurones des souris déficientes pour le gène codant la protéine MAP1B migrent de manière anormale et présentent des neurites avec des défauts de croissance (Gonzalez-Billault et al., 2000 ; Edelman et al., 1996). Quand la protéine MAP1B est phosphorylée, on observe une diminution de la stabilité des microtubules (Goold et al., 1999). MAP1B a donc un rôle crucial dans la croissance et la différenciation neuronale en influençant la dynamique des microtubules. La protéine MAP1A est fortement exprimée au niveau des dendrites et joue un rôle dans le contrôle de la synaptogenèse. L'augmentation croissante de son expression est corrélée avec l'expansion de l'arborisation dendritique des neurones (Szebenyi et al., 2005).

Les protéines MAP2 sont issues de l'épissage alternatif de l'ARNm d'un gène unique (Neve et al., 1986). Cette famille est divisée en deux groupes : les MAP2 de haut poids moléculaire (MAP2A et MAP2B, 280 kDa et 270 kDa respectivement), et les MAP2 de faible poids moléculaire (MAP2C et MAP2D, 65 kDa et 70 kDa respectivement). Chacune de ces isoformes est composée d'une région C-terminale qui contient 3 ou 4 séquences répétées de 18 aa. L'ensemble de ces répétitions forme le domaine de liaison aux microtubules (Lewis et al., 1988) (Figure 12A). Les protéines MAP2 s'associent aux microtubules et régulent leur dynamique en les stabilisant (Ferhat et al., 1996). Elles sont également capables de les organiser en faisceaux au niveau des dendrites (Takemura et al., 1995) (Figure 13B). L'activité de MAP2 dépend de leur état de phosphorylation : non phosphorylées ou hyperphosphorylées, elles n'interagissent plus avec les microtubules (Brugg et Matus, 1991). Les domaines de liaison aux microtubules pourraient également se lier aux filaments d'actine. Plus particulièrement, il a été montré que l'isoforme MAP2C interagissait directement avec les filaments d'actine et les organisait en faisceaux (Ozer et Halpain, 2000 ; Roger et al., 2004). Les protéines MAP2 sont presque exclusivement exprimées au niveau du corps cellulaire et des dendrites du neurone (Bernhardt et Matus, 1982 ; Caceres et al., 1984). Les isoformes MAP2C et MAP2D sont également présentes dans les cellules gliales (Meichsner et al., 1993 ; Doll et al., 1993). MAP2B est exprimée tout au long du développement du système nerveux et persiste à l'âge adulte, alors que MAP2A est exprimée surtout dans les neurones adultes (Binder et al., 1984). L'expression de MAP2C diminue très tôt dans le développement neuronal (Garner et Matus, 1988), ce qui est corrélé avec l'augmentation de l'expression de MAP2A (Chung et al., 1996). MAP2D est exprimée continuellement au cours de la vie du neurone et majoritairement au niveau du corps cellulaire (Ferhat et al., 1998). MAP2D est la

seule des isoformes de MAP2 à être, en plus des neurones, exprimée dans les cellules de la granulosa des ovaires. Elle participerait ainsi aux processus de maturation pré-ovulatoire (Salvador et al., 2004).

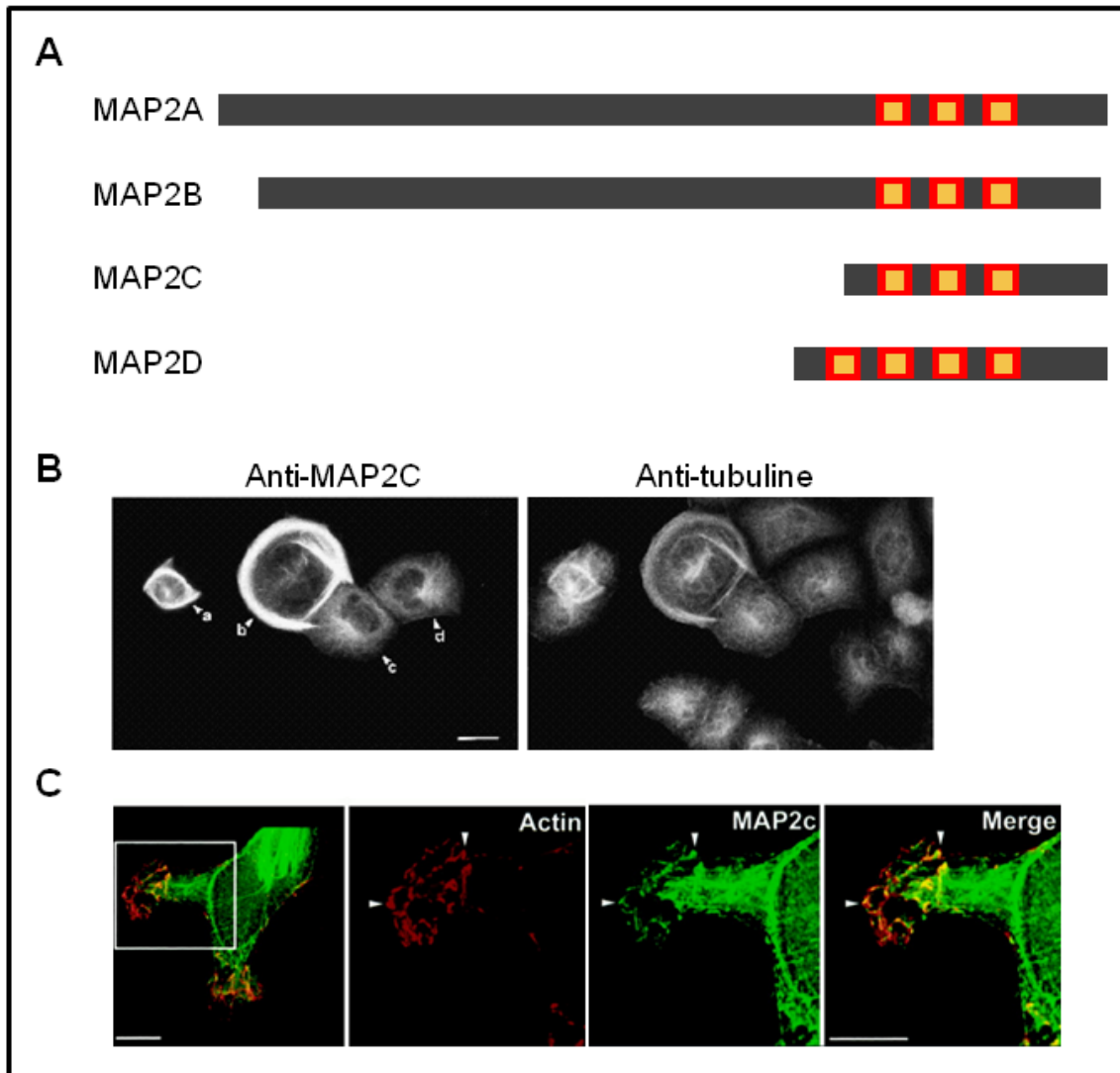


Figure 12. Structure et fonctions des protéines MAP2. (A) Représentation schématique des 4 isoformes de la protéine MAP2. En rouge, domaines de liaison aux microtubules, qui sont les mêmes que les domaines de liaison à l'actine (en jaune). (B) MAP2C forme des faisceaux de microtubules dans les cellules PLC fortement transfectées (a et b). MAP2C est co-localisée avec les microtubules dans les cellules faiblement transfectées (c et d). Barre d'échelle : 20 μ m (d'après Weisshaar et al., 1992). (C) MAP2C s'associe avec l'actine quand la kinase PKA des cellules HeLa est activée. Barre d'échelle : 10 μ m (d'après Ozer et Halpain, 2000).

L'inhibition de l'expression du gène de MAP2 dans le cerveau de souris n'entraîne aucune anomalie dans l'organisation de leur système nerveux central, ce qui indique que MAP2 n'est pas indispensable à la morphogenèse neuronale (Teng et al., 2001). En revanche, des souris invalidées à la fois pour les gènes MAP2 et MAP1B meurent juste après la naissance. Leurs neurones présentent une désorganisation du réseau microtubulaire neuritique

et un retard de migration neuronal. Les effets synergiques causés par la perte de MAP2 et de MAP1B sont plus flagrants dans les dendrites que dans les axones. Ces résultats suggèrent des fonctions redondantes entre MAP2 et MAP1B dans l'organisation des microtubules dendritiques lors de la différenciation neuronale.

La protéine tau est présente sous six isoformes dans le cerveau humain, toutes issues de l'épissage alternatif d'un gène unique. Elle est principalement exprimée dans les neurones mais aussi dans les oligodendrocytes (LoPresti et al., 1995 ; Müller et al 1997), les reins, les poumons et les testicules (Gu et al., 1996). Elle est plus abondante dans les axones en cours de développement (Trojanowsky et al., 1989) (Figure 13B) mais peut aussi être trouvée dans le compartiment somato-dendritique des neurones (Tashiro et al., 1997 ; Ittner et al., 2010 ; Frandemichie et al., 2014). Elle peut être subdivisée en 4 régions principales : un domaine de projection N-terminal constitué de 0, 1 ou 2 séquences répétées (isoformes 0N, 1N et 2N respectivement), un domaine riche en proline, un domaine de liaison aux microtubules (MTBD) constitué de 3 ou 4 séquences répétées (isoformes 3R et 4R respectivement) de 31 ou 32 aa chacune, et un domaine C-ter (Mandelkow et al., 1996) (Figure 13A). Les répétitions du MTBD sont semblables à celles retrouvées dans la séquence de MAP2. Tau et MAP2 possèdent aussi toutes les deux un domaine de projection chargé négativement (pour revue : Dehmelt et Haplain, 2005). Toutes les isoformes de tau sont capables de lier les microtubules et de les stabiliser (Trinczek et al., 1995), même si les isoformes 4R ont une plus grande affinité pour les microtubules que les isoformes 3R (Lu et Kosik, 2001). Tau a également été proposée comme interagissant avec l'actine, même si cette interaction fut controversée (Roger et al., 2004 ; Yu et Rasenick 2006 ; Fulga et al., 2007 ; He et al., 2009) (Figure 13D). Le domaine riche en proline ainsi que le domaine de liaison aux microtubules joueraient un rôle dans cette interaction. La liaison de tau aux microtubules est fortement régulée par phosphorylation (Cho et Johnson, 2003). Dans des cas pathologiques, comme par exemple dans la maladie d'Alzheimer, tau est sous forme hyperphosphorylée et s'agrège, conduisant à la formation d'enchevêtrements neurofibrillaires (Grundke-Iqbal et al., 1986).

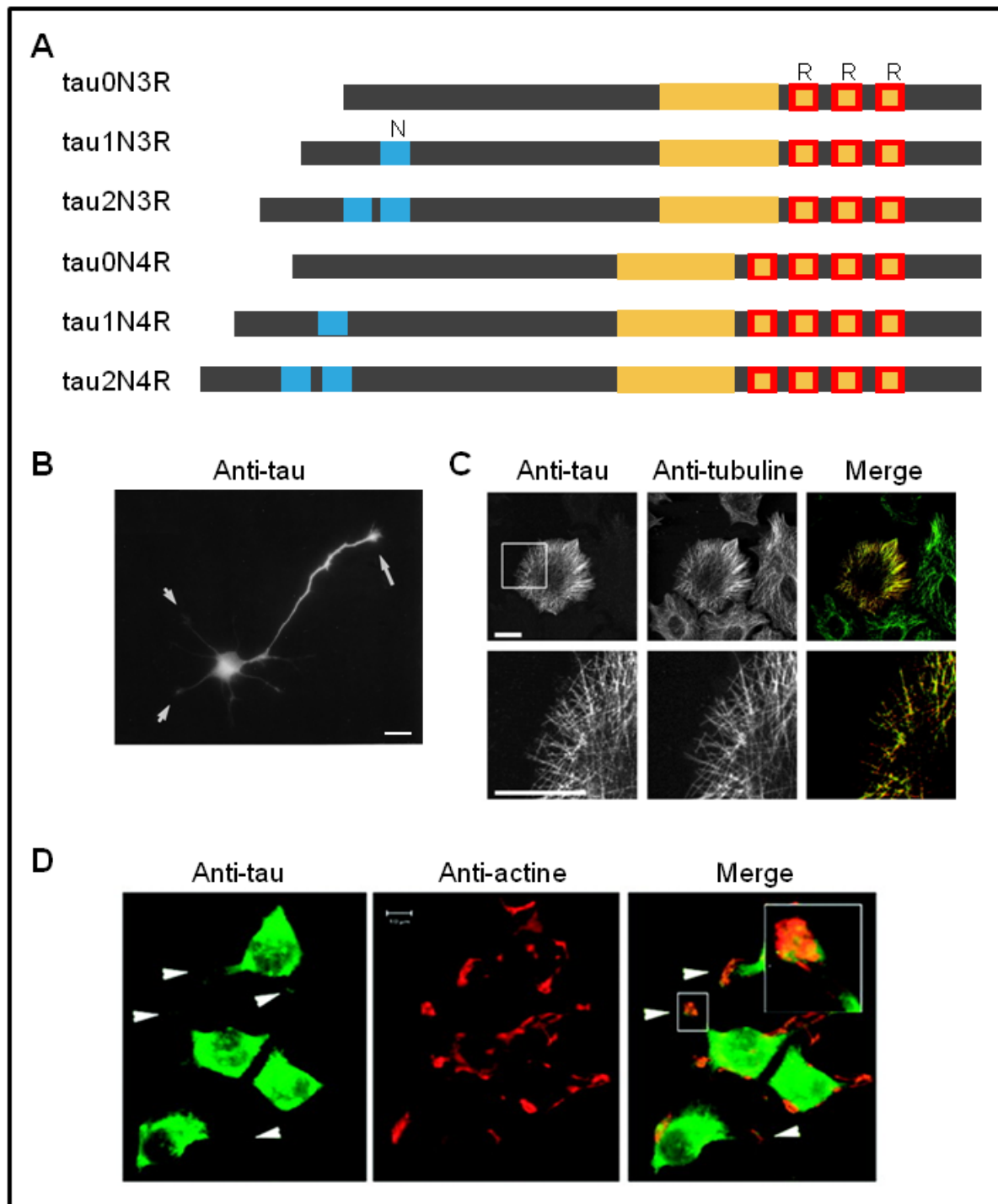


Figure 13. Structure et fonctions des protéines tau. (A) Représentation schématique des 6 isoformes de tau. En rouge : domaines de liaison aux microtubules, en bleu : séquences répétées du domaine N-terminal, en jaune : domaines de liaison à l'actine. (B) Localisation de tau dans un neurone en cours de différenciation. Barre d'échelle : 10 μ m (tiré de Mandell et Banker, 1996). (C) Tau0N4R co-localise avec les microtubules après son injection dans des cellules MCF7. Barre d'échelle : 20 μ m (tiré de Bunker et al., 2004). (D) Co-localisation de tau endogène avec l'actine dans des structures similaires aux lamellipodes après traitement des cellules PC12 au NGF (Nerve Growth Factor). Bar d'échelle : 10 μ m (tiré de Yu et Rasenick, 2006).

L'isoforme tau0N3R est la seule exprimée au cours du développement embryonnaire et disparaît ensuite, alors que les autres isoformes apparaissent plus tard (Kosik et al., 1989). L'inhibition de l'expression de tau par des ARNm anti-sens entraîne un ralentissement de sa croissance axonale dans des cultures primaires de neurones (Caceres et Kosik, 1990), indiquant que tau jouerait un rôle dans la maturation neuronale. Cependant, l'invalidation chez la souris du gène codant pour tau n'a pas de conséquences significatives sur la croissance des neurites (Harada et al., 1994). Des phénomènes compensatoires avec d'autres MAPs, par exemple avec MAP1B (Takei et al., 2000), peuvent expliquer cette absence de défauts. Je décrirai de façon plus détaillée la structure et les fonctions de tau dans la partie III de cette introduction.

Les principales autres MAPs neuronales comprennent la doublecortine (DCX) et MAP6. DCX est impliqué dans la nucléation et la stabilisation de microtubules à 13 profilaments et joue un rôle central dans l'organisation du cytosquelette au cours de la migration et la différenciation neuronale (Francis et al., 1999 ; Schaar et al., 2004). DCX a également été montrée comme se liant aux filaments d'actine et comme établissant un lien direct entre microtubules et actine (Tsukada et al., 2005). Des mutations de cette protéine sont à l'origine de la Lissencéphalie de type I lié au chromosome X, maladie caractérisée par une déficience intellectuelle et une épilepsie sévère. Les protéines MAP6 ou STOP (pour Stable Tubule Only Polypeptide) constituent une autre famille de MAPs neuronales, ayant la caractéristique unique de stabiliser les microtubules au froid (Bosc et al., 1996 ; Guillaud et al., 1998). Elles sont également capables de réguler le cytosquelette d'actine et jouent un rôle dans la transmission synaptique. Les souris STOP KO présentent de nombreux déficits comportementaux qui peuvent être apparentés aux symptômes observés chez les patients schizophrènes (Frankle et al., 2003) et représentent donc un modèle d'étude de cette pathologie. D'autres MAPs non spécifiques du système nerveux central ont également été identifiées. C'est le cas de MAP4 chez les mammifères, que l'on retrouve dans presque tous les types cellulaires, et de son orthologue XMAP230 chez le xénope. Cette dernière stimule l'élongation des microtubules et supprime les catastrophes *in vitro* (Andersen et al., 1994). D'autres MAPs ont été extraites à partir d'œufs de xénope (XMAP210, XMAP215 (homologue humain ch-TOG), XMAP310). Elles ont toutes un effet stabilisateur sur les microtubules (Cassimeris et Spittle, 2001). De plus, plusieurs acteurs chez la plante et la levure sont impliqués dans la stabilisation des microtubules et leur organisation en faisceaux anti-parallèles, comme la famille des MAP65 (PRC1 chez les mammifères). La particularité

de ces MAPs est qu'elles ont peu d'effet sur la dynamique des microtubules mais peuvent générer des faisceaux de microtubules (Hussey et al., 2002).

ii. Les +TIPs

Les +TIPs (ou « + end tracking proteins ») interagissent préférentiellement à l'extrémité (+) des microtubules en croissance (Schuyler et Pellman, 2001). Ces protéines régulent la dynamique des microtubules et sont également impliquées dans l'interaction du bout (+) des microtubules avec différentes cibles cellulaires (membranes, chromosomes, organelles...). Le premier membre de la famille des +TIPs à avoir été identifié est la protéine CLIP-170 (pour Cytoplasmic Linker Protein of 170 kDa) (Rickard et Kreis, 1990). Le comportement caractéristique de cette +TIP a été observé pour la première fois en 1999 (Diamantopoulos et al., 1999 ; Perez et al., 1999) : elle suit l'extrémité des microtubules en croissance et forme des comètes qui se déplacent vers la périphérie cellulaire. Par la suite, d'autres protéines présentant le même comportement ont été identifiées, comme EB1 (pour End Binding protein 1), CLIP-115, p150^{glued} et la famille des CLASPS (pour CLIP-Associated Proteins) (pour revues : Carvalho et al., 2003 ; Morrison, 2007).

Plusieurs modèles ont été proposés pour expliquer la localisation préférentielle des +TIPs aux bouts des microtubules, comme leur transport par un moteur moléculaire (Busch et al., 2004 ; Carvalho et al., 2004) ou la reconnaissance directe d'une structure spécifique de l'extrémité des microtubules (Maurer et al., 2012 ; Vitre et al., 2008). C'est le cas de EB1 par exemple qui reconnaît un état conformationnel de la tubuline liée au GTP (Maurer et al., 2011 ; Bieling et al., 2008). Les +TIPs sont capables d'interagir entre elles pour former des complexes protéiques, ce qui permet de moduler leur activité et leur localisation. L'un des acteurs centraux de cette régulation est EB1 qui interagit avec la majorité des autres +TIPs qu'elle recrute au bout des microtubules (pour revue : Galjart, 2010). Ces différents complexes se lient à différents composants subcellulaires, comme la membrane plasmique, les vésicules ou les filaments d'actine (Figure 14). Elles interviennent ainsi dans la capture des microtubules au cortex mais également aux kinétochores des chromosomes lors de la division cellulaire. Au niveau des neurones, elles jouent un rôle essentiel, grâce à ces différentes interactions, dans le développement neuronal, en participant activement à la migration neuronale, la croissance et la guidance de l'axone.

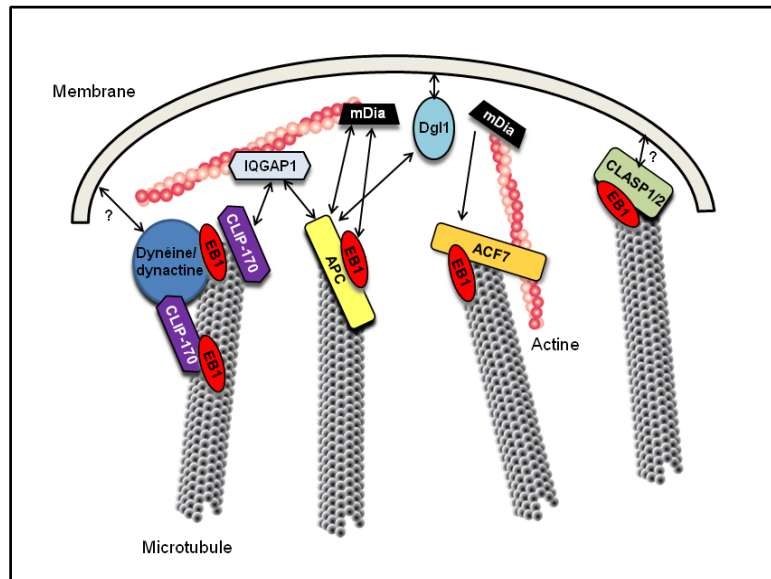


Figure 14. Modèle de l'attachement des microtubules à la membrane. L'actine joue un rôle central dans l'ancrage des microtubules au cortex. IQGAP1 se lie à l'actine et recrute l'extrémité (+) des microtubules via CLIP-170 ou APC. APC peut interagir avec EB1 et mDia, une protéine liée à l'actine, ou attacher directement les microtubules à la membrane via Dgl1. La spectraplakine ACF7 établit un lien direct entre microtubules et actine via son interaction avec EB1, laquelle est régulée par mDia. Un autre mécanisme de capture peut être établi par CLASP1/2, qui se lie directement au cortex, avec l'aide de EB1. Le complexe dynéine/dynactine, attaché à la membrane, pourrait faire glisser les microtubules le long de la membrane, ce qui permettrait aux microtubules d'exercer une force sur le cortex. CLIP-170 contribue à la localisation de la dynéine au bout des microtubules via une interaction directe avec la dynactine (d'après Lansbergen et Akhmanova, 2006).

iii. Les protéines de déstabilisation

Pour permettre la réorganisation des systèmes microtubulaires complexes dans les cellules, des mécanismes de déstabilisation des microtubules doivent intervenir pour s'opposer aux mécanismes de stabilisation. Cette déstabilisation est permise par l'action de facteurs de catastrophes. Ce sont des protéines qui ont la capacité de diminuer la vitesse d'élongation des microtubules, de stimuler les phénomènes de catastrophes et/ou de diminuer la fréquence des sauvetages.

On trouve parmi ces facteurs de déstabilisation la OP18/Stathmine (Oncoprotein 18/Stathmine), XKCM1 (Xenopus Kinesin Catastrophe Modulator-1) et la katanine. OP18/Stathmine est une protéine de 17 kDa surexprimée dans différents types de tumeurs. Elle agit *in vitro* en séquestrant les dimères de tubuline ou en interagissant directement aux extrémités des microtubules pour stimuler la survenue de catastrophes (Howell et al., 1999 ; Andersen, 2000 ; pour revue : Cassimeris, 2002). XKCM1 chez le xénope, et son homologue

MCAK (Mitotic Centromere Associated Kinesin) chez les mammifères, sont des membres de la sous-famille des kinésines-13. Ces protéines utilisent l'énergie de l'hydrolyse de l'ATP pour déstabiliser les extrémités des microtubules et augmenter leur fréquence de catastrophes (Kinoshita et al., 2006). Il a été proposé qu'elles stabiliseraient la conformation courbe des protofilaments au bout des microtubules, déclenchant spontanément la rupture des liaisons latérales entre protofilaments (Ogawa et al., 2004). La katanine est une protéine dimérique qui forme un hexadimère capable de rompre, en présence d'ATP, les liaisons entre les sous-unités α et β de la tubuline. L'effet de cette protéine est donc de couper les microtubules (Quarmby, 2000). La spastine est une autre protéine capable de fractionner les microtubules et qui est également organisée sous forme d'un hexadimère. Roll-Mecak et Vale proposent en 2008 qu'un pore présent au centre de cet hexadimère fixerait l'extrémité C-terminale de la tubuline et que la coupure entre monomères de tubuline serait provoquée par une force de traction de l'hexadimère sur cette extrémité, entraînant le dépliement de la structure tridimensionnelle de la protéine.

Pour une régulation précise du réseau microtubulaire dans la cellule, il est donc nécessaire qu'il y ait une coordination dans le temps et dans l'espace entre les MAPs stabilisatrices et les protéines de déstabilisation. L'intérêt de ces effets antagonistes a été montré par la mise en place d'un fuseau de division fonctionnel dans des extraits d'œuf de xénope, où la dynamique des microtubules est finement régulée par la balance entre l'action de XMAP215 qui s'oppose à celle de XKCM1 (Tournebize et al., 2000). Cette activité antagoniste a pu être reconstituée *in vitro* à partir de composants purifiés (tubuline, XMAP215, XKCM1) (Kinoshita et al., 2001). *In vivo*, l'action de ces protéines est fortement régulée par phosphorylation (Cassimeris et Spittle, 2001 ; Vasquez et al., 1999).

iiii. Les moteurs moléculaires

Les moteurs moléculaires ou MAPs motrices permettent d'acheminer, le long des microtubules, des composants de la cellule, tels que des vésicules, des mitochondries, des ARNs, ou diverses protéines comme les +TIPs. Ils sont ubiquitaires chez les eucaryotes. Dans les neurones, ces moteurs ont un rôle essentiel. Ils sont par exemple nécessaires au transport des neurotransmetteurs, synthétisés au niveau du corps cellulaire, jusqu'aux terminaisons pré-synaptique. Il existe deux grandes familles de moteurs moléculaires : les kinésines et les dynéines.

Il existerait environ 100 kinésines différentes issues de 14 familles. La kinésine-1, ou kinésine conventionnelle car la plus abondante, est une protéine tétramérique composée de deux chaînes légères et de deux chaînes lourdes (pour revue : Hirokawa et al., 2010). Les chaînes lourdes sont composées, le plus souvent, d'une tête globulaire contenant le domaine moteur et le domaine de liaison aux microtubules, et d'une queue sur laquelle se lie le cargo à transporter. Au niveau des régions motrices, il existe une grande homologie de structure entre les différentes kinésines, ce qui n'est pas le cas pour le domaine qui se projette hors du microtubule, conférant ainsi une spécificité des kinésines pour l'élément à déplacer. La kinésine-1 est responsable du transport antérograde, c'est-à-dire du transport se réalisant de l'extrémité (-) du microtubule vers son extrémité (+). Ce mouvement dépend de l'état du nucléotide ATP associé à la protéine. Lorsqu'il y a hydrolyse d'ATP, la protéine subit des changements conformationnels qui permettent son mouvement sur le microtubule (Hirokawa et al., 1991). Certaines kinésines, comme Eg5, une protéine tétramérique, associent latéralement les microtubules anti-parallèles pour en faire des faisceaux au niveau de la midzone du fuseau mitotique (Goshima, 2006). Elles participent ainsi à la régulation de la longueur et de la structure du fuseau en faisant glisser les microtubules les uns par rapport aux autres (Figure 15).

La dynéine est un complexe multi-protéique, constitué de deux chaînes lourdes, deux chaînes intermédiaires, quatre chaînes intermédiaires légères et de plusieurs chaînes légères (Vallee et al., 2004). Les chaînes lourdes contiennent le domaine de liaison aux microtubules et six domaines AAA responsables de l'hydrolyse d'ATP nécessaire au mouvement du moteur moléculaire, qui se fait, contrairement à la kinésine, de façon rétrograde (du bout (+) des microtubules vers le bout (-)). Les chaînes intermédiaires ainsi qu'une des chaînes légères participent à l'interaction de la protéine avec les organites à transporter (Steffen et al., 1997 ; Nagano et al., 1998). A l'heure actuelle, on ne connaît pas exactement le rôle de chacune des autres chaînes. Dans les neurones, la dynéine permet de transporter des organelles et des vésicules le long de l'axone, du compartiment pré-synaptique vers le corps cellulaire (Mok et al., 2001 ; Di Bella et al., 2001).

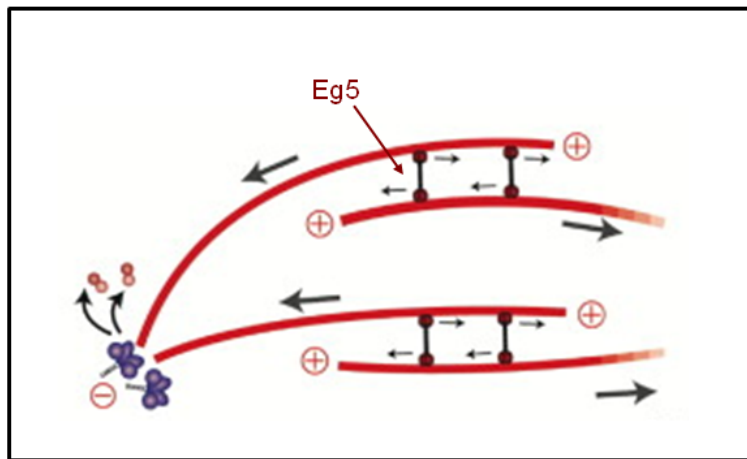


Figure 15. Kinésine formant des faisceaux de microtubules anti-parallèles au niveau de la midzone. Chacune des têtes de la kinésine (par exemple Eg5) se déplace vers le bout (+) du microtubule, les faisant glisser l'un par rapport à l'autre, mouvement qui est coordonné avec leur dépolymérisation au bout (-) (d'après Gadde et Heald, 2004).

Ces moteurs moléculaires peuvent rentrer en compétition avec les MAPs se liant à la paroi du microtubule. En effet, ces dernières peuvent gêner la progression des moteurs. Par exemple, une compétition pour l'accès aux microtubules a lieu entre tau et la kinésine dans les neurones (Dixit et al., 2008). La présence de tau en quantité importante sur le microtubule induit le détachement de la kinésine des microtubules, alors qu'elle ferait changer la dynéine de direction de déplacement. Les modulations différentielles de la mobilité de la kinésine et de la dynéine suggèrent que la localisation des MAPs pourrait réguler spatialement le transport axonal dépendant des microtubules.

2. L'actine

a) Base structurale du monomère et du filament d'actine

L'actine monomérique (actine G, pour actine globulaire) est une protéine globulaire de 43 kDa, exprimée en très grande quantité dans les cellules eucaryotes. Elle a été découverte par Straub dans les années 40 (Straub, 1942). Les séquences des gènes codant pour l'actine sont conservées à 80% entre les espèces. Certaines espèces possèdent plusieurs isoformes d'actine, spécifiques du type cellulaire. Par exemple, l'homme possède 6 isoformes d'actine, identiques entre elles à 95% dans leur séquence peptidique. Elles appartiennent à trois types d'actine issus de gènes différents : l'actine α , spécifique des cellules musculaires, l'actine β et l'actine γ , présentes dans tous les autres types cellulaires (Khaitlina, 2001). L'analyse cristallographique de la protéine montre qu'elle est séparée en deux domaines par un sillon à l'intérieur duquel peuvent se fixer un cation divalent (calcium ou magnésium) et un nucléotide (ATP ou ADP) (Figure 16). Le monomère est polarisé, avec une extrémité pointue et une extrémité barbue.

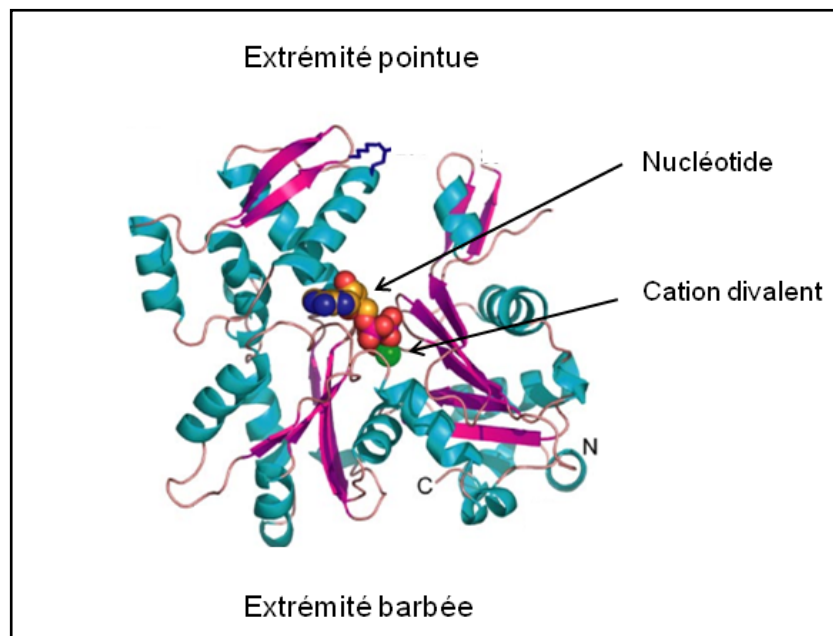


Figure 16. Représentation tridimensionnelle de la structure du monomère d'actine. Au centre de la protéine se trouve un sillon où viennent se fixer le nucléotide et le cation divalent (d'après Rould et al., 2006).

Dans les cellules, le monomère d'actine est généralement associé à un cation Mg^{2+} et la majorité de l'actine monomérique se trouve liée à l'ATP. En effet, l'affinité de liaison de l'actine est supérieure pour l'ATP et son hydrolyse spontanée est très lente lorsqu'il est

complexé au monomère. Les différences structurales entre l'actine-ATP et l'actine-ADP semblent mineures (Sablin et al., 2002).

L'actine polymérise sous forme fibrillaire (actine F, pour actine filamenteuse) (Figure 17A). Des modèles structuraux du filament d'actine ont pu être établis par microscopie électronique (Holmes et al., 1990) et des études récentes en cryo-ME ont permis de déterminer sa structure à une résolution de 5 Å (Figure 17B et C) (Murakami et al., 2010). Le filament d'actine est composé de deux chaînes linéaires d'actine G qui s'enroulent l'une autour de l'autre pour former une double hélice d'un diamètre de 5 à 8 nm. Le pas de cette hélice est d'environ 72 nm avec 13 sous-unités par tour d'hélice. Comme le microtubule, le filament d'actine est polarisé : on distingue l'extrémité barbée de l'extrémité pointue. Le site de liaison à l'ATP se situe vers l'extrémité pointue et les nouvelles sous-unités sont incorporées à l'extrémité barbue lors de l'assemblage des monomères en filament.

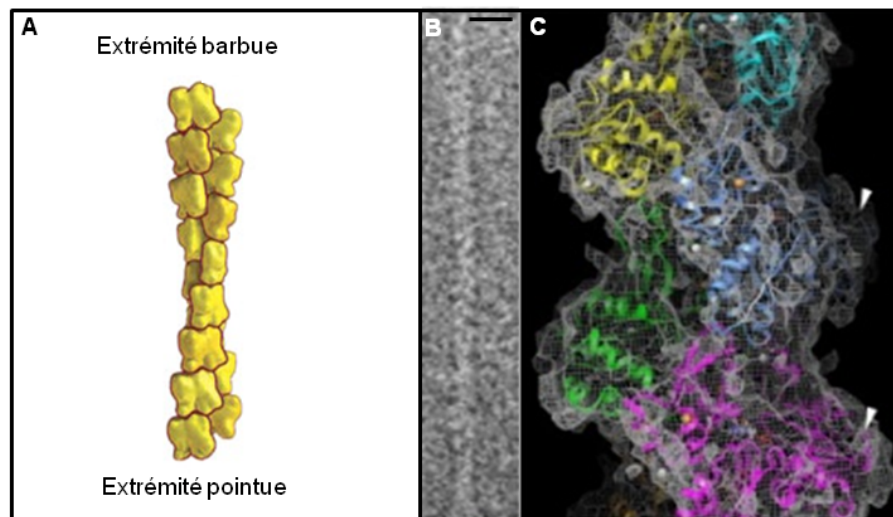


Figure 17. Structure du filament d'actine. (A) Schéma représentant la double hélice polarisée résultant de l'assemblage d'actine G. (B) Un filament d'actine observé en cryo-ME. (C) Structure tridimensionnelle du filament d'actine. Chaque monomère est représenté par une couleur différente. Les cations divalents sont indiqués par des sphères orange. Les flèches blanches pointent l'extrémité N-terminale des sous-unités d'actine (d'après Murakami et al., 2010).

b) Polymérisation de l'actine *in vitro*

Le processus de polymérisation de l'actine nécessite une concentration en actine G au-dessus de sa concentration critique de nucléation (Yanagida et Oosawa, 1975) (0,1 μM pour l'extrémité barbée, 0,8 μM pour l'extrémité pointue, Pollard et al., 2000), de l'énergie sous forme d'ATP et une concentration suffisante en sel. En effet, en-dessous de concentrations en

sels comparables aux concentrations physiologiques (environ 50 mM KCl, 10 mM MgCl₂), l'actine se trouve à l'équilibre sous forme monomérique. L'augmentation de la concentration en sel dans le milieu permet d'amorcer la polymérisation de l'actine. Cette réaction de polymérisation *in vitro* est classiquement décomposée en trois phases (Carlier et al., 1991).

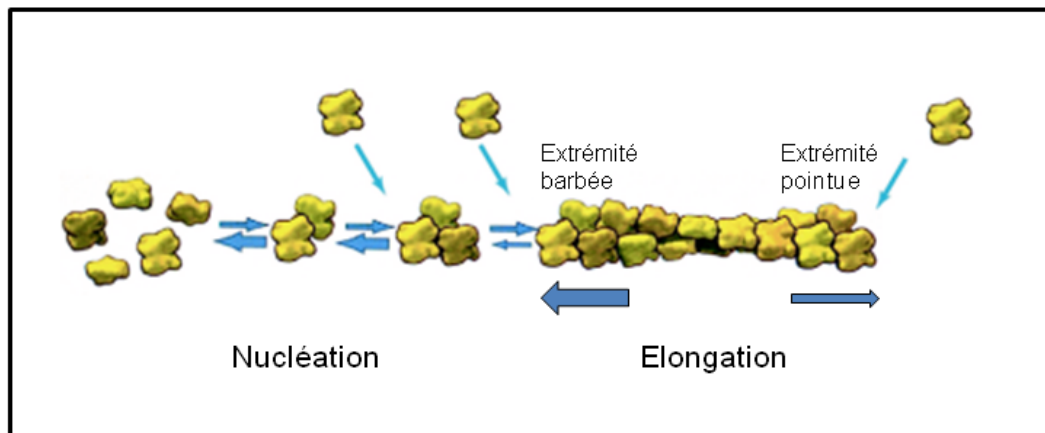


Figure 18. Mécanismes de polymérisation de l'actine. L'actine passe par deux états dimériques et trimériques instables avant de former des filaments hélicoïdaux pouvant s'allonger. L'ajout de monomères se fait plus rapidement à l'extrémité barbée qu'à l'extrémité pointue (d'après Pollard et Cooper, 2009).

Lors de la première étape, dite de nucléation, les monomères d'actine s'auto-assemblent sous forme d'oligomères thermodynamiquement instables. Dès la formation de trimères d'actine G, ceux-ci adoptent une conformation hélicoïdale, deviennent thermodynamiquement stables et la polymérisation commence aux deux extrémités du filament d'actine (Figure 18). Dans une deuxième phase, dite d'élongation, les monomères d'actine s'ajoutent aux extrémités barbée et pointue du filament en cours de formation. Au cours de cette incorporation, il y a hydrolyse d'ATP. Contrairement à l'actine monomérique, l'actine filamenteuse ne peut pas échanger son nucléotide. Ainsi, les sous-unités d'actine évoluent toutes d'un état ATP à un état ADP qui n'est pas réversible. De ce fait, comme pour les microtubules, les cinétiques d'assemblage et de désassemblage des sous-unités d'actine dépendent de l'extrémité considérée : l'extrémité barbée riche en actine-ATP favorise l'assemblage des monomères, alors que l'extrémité pointue riche en actine-ADP favorise leur dissociation. Enfin, dans la troisième phase, dite phase stationnaire, l'actine arrive à un état d'équilibre entre ses deux formes monomérique et filamenteuse. Ce phénomène intervient lorsque la concentration d'actine libre est égale à sa concentration critique d'assemblage. A ce moment, la longueur moyenne du filament ne varie pas mais les monomères d'actine assemblés à l'extrémité

pointue se dissocient du filament et migrent vers l'extrémité barbée. C'est le processus de « treadmilling » ou « tapis roulant » (Wegner, 1976) (Figure 19).

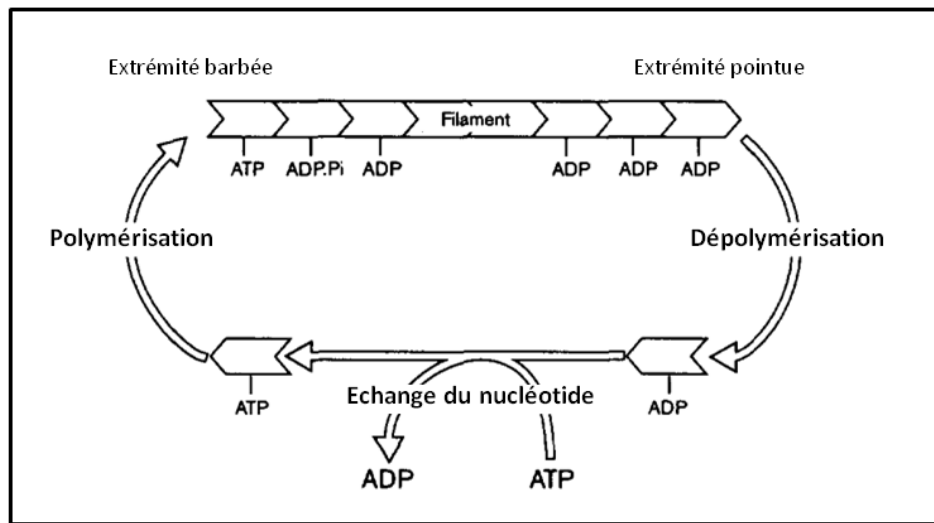


Figure 19. Mécanisme de « treadmilling » de l'actine à l'état stationnaire. Les sous-unités d'actine liées à l'ATP s'ajoutent à l'extrémité barbée des filaments d'actine. L'hydrolyse de l'ATP intervient au sein du filament. La dissociation des sous-unités ADP se fait à l'extrémité pointue du filament. Les monomères libérés perdent leur ADP pour fixer une molécule d'ATP. Les monomères ATP peuvent à nouveau être incorporés dans le filament au niveau de l'extrémité barbée (d'après Carlier, 1998).

La vitesse de dépolymérisation des sous-unités ADP à l'extrémité pointue due au phénomène de « treadmilling » est extrêmement lente, d'où une faible vitesse de recyclage des sous-unités d'actine. Or, dans la cellule, on retrouve une quantité importante d'actine monomérique responsable de fortes vitesses de polymérisation, ainsi qu'un remodelage rapide des structures des filaments induit lors de la signalisation. *In vivo*, ces phénomènes font intervenir des protéines contrôlant la dynamique d'assemblage et de désassemblage des réseaux complexes de filaments d'actine.

c) Les protéines de régulation de l'actine

Les protéines qui interagissent directement avec l'actine et peuvent moduler ses caractéristiques structurales et/ou dynamiques sont les ABPs (Actin Binding Proteins). Il y a plus de 60 familles de protéines interagissant avec l'actine. On peut regrouper les ABP suivant leur rôle sur les paramètres structuraux ou dynamiques de l'actine. Certaines peuvent intervenir à différents niveaux en même temps. Les ABPs peuvent donc :

- Maintenir une concentration élevée d'actine monomérique nécessaire au renouvellement rapide des filaments d'actine.
- Nucléer des filaments d'actine.
- Dépolymériser les filaments d'actine.
- Organiser les filaments d'actine en structures élaborées.

Dans la première catégorie, on trouve la profiline, une protéine qui se lie aux monomères d'actine et qui joue un rôle important dans l'homéostasie de l'actine (Almo et al., 1994 ; Kang et al., 1999 ; Pollard et al., 2000). Elle est capable d'inhiber la formation spontanée de dimères ou de trimères d'actine en séquestrant les monomères d'actine G, à la base de nouveaux filaments d'actine. La profiline se lie sur la face barbée du monomère. L'actine monomère qui est complexée avec la profiline peut seulement être utilisée pour la polymérisation d'actine catalysée par des facteurs de nucléation. Parmi ces facteurs, on trouve le complexe Arp2/3, activé par la famille des protéines WASP/WAVE, et les formines. En présence de profiline et de formine, la vitesse de polymérisation des filaments d'actine à l'extrémité barbée est augmentée de presque dix fois (Higashida et al., 2004 ; Kovar et al., 2006 ; Romero et al., 2004). La profiline permet également de faire croître le filament uniquement à son extrémité barbée et d'inhiber sa polymérisation à l'extrémité pointue, donnant ainsi une polarité accentuée à la croissance (Pring et al., 1992). Pour maintenir un pool d'actine G élevé et contrôler localement la polymérisation d'actine, la cellule dispose également de protéines de coiffe qui interagissent fortement avec l'extrémité barbée du filament (Schafer et Cooper, 1995). On peut les classer en trois familles : les « capping proteins », les gelsolines et les villines. Les villines peuvent aussi organiser les filaments d'actine en faisceaux parallèles.

Pour polymériser et libérer son pool de monomères ou son extrémité barbée, l'actine a besoin de la présence de facteurs de nucléation. Le complexe Arp2/3 est un complexe stable et abondant impliqué dans de nombreuses fonctions cellulaires. En particulier lors de la protrusion des lamellipodes, le complexe Arp2/3 est responsable de la formation des réseaux branchés de filaments d'actine (Mullins et al., 1998 ; Svitkina et Borisy, 1999). En effet, il permet la nucléation de filaments d'actine sur le côté d'un filament pré-existant (Blanchoin et al., 2000). Ayant une homologie structurale avec l'actine, les deux sous-unités Arp2 et Arp3

mimeraient la structure d'un oligomère d'actine et formeraient un noyau dimérique stable favorisant la formation d'un nouveau filament avec un angle de 70° par rapport au premier (Robinson et al., 2001). Afin de maintenir ce réseau branché, les protéines de coiffe interviennent pour empêcher la polymérisation d'actine aux extrémités barbées (Kawska et al., 2012) (Figure 20A).

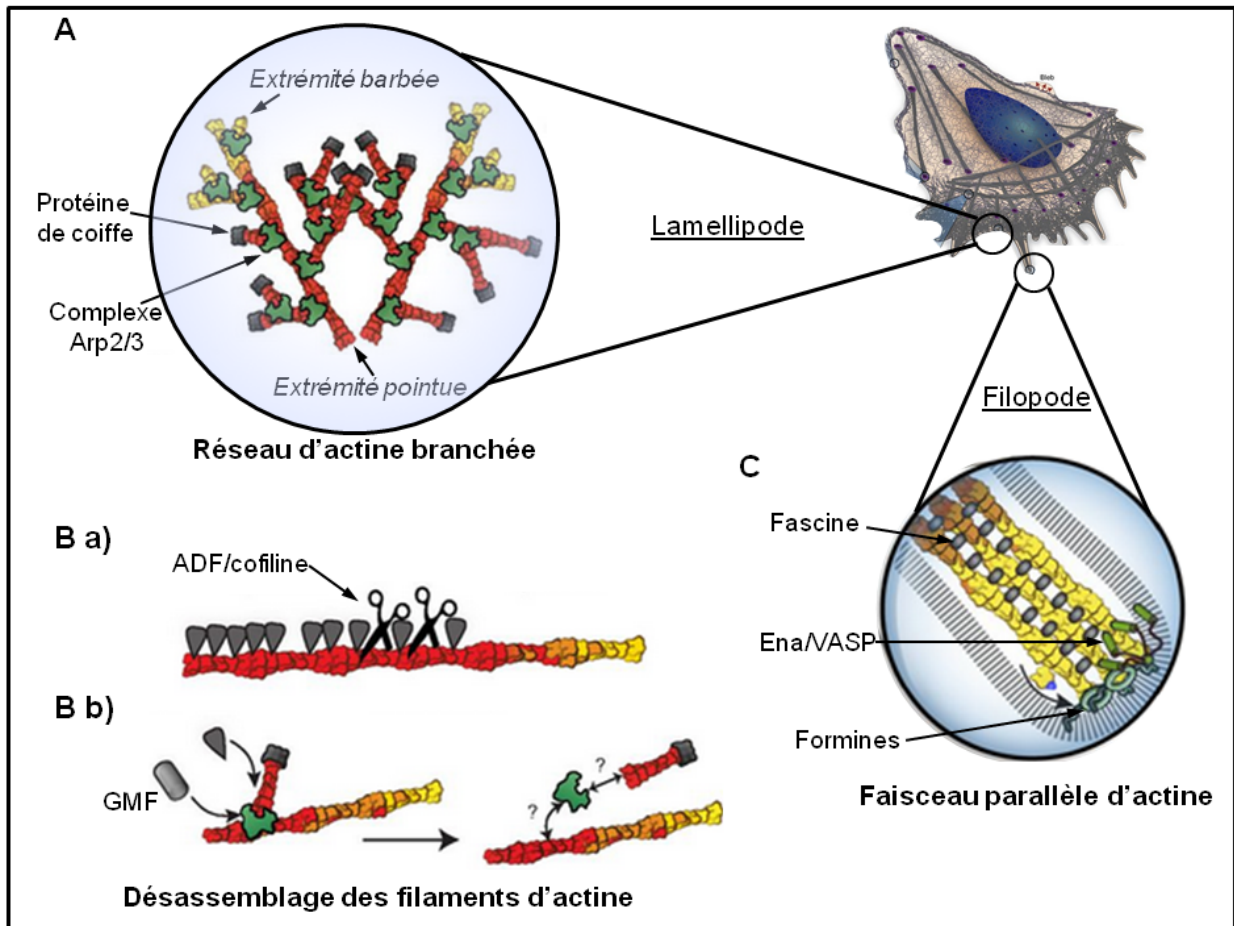


Figure 20. Organisation et régulation du réseau d'actine par quelques ABPs. (A) Les lamellipodes contiennent un réseau d'actine branché résultant de l'activité du complexe Arp2/3 qui génère un réseau branché à partir du côté d'un filament d'actine pré-existant. En présence de protéines de coiffe, les branches sont maintenues à une longueur donnée. (B) Les filaments d'actine peuvent être désassemblés par le complexe ADF/cofiline soit par fragmentation des filaments en filaments plus petits (Ba) soit par la désorganisation du réseau branché suite à l'inhibition d'Arp2/3 (Bb). D'autres protéines comme le GMF peuvent aussi induire la dissociation des branches. (C) Les filopodes sont remplis de faisceaux d'actine parallèles dont les filaments ont été polymérisés par les formines et le complexe Ena/VASP, et sont maintenus associés entre eux par la fascine (adapté de Blanchoin et al., 2014).

Les formines sont également des facteurs de nucléation de l'actine (Pruyne et al., 2002). Elles stabiliseraient un dimère ou un trimère d'actine (Pring et al., 2003). Un autre nucléateur découvert plus récemment est Spire (Quinlan et al., 2005). L'activité de nucléation de Spire

est comparable à celle des formines et moindre que celle du complexe Arp2/3. Spire contient 4 domaines capables d'interagir chacun avec l'actine. Ils pourraient donc, par leur interaction avec l'actine monomérique, regrouper les monomères pour faciliter la formation d'un noyau stable d'actine. Suite à la nucléation d'un nouveau filament, Spire reste fixé à son extrémité pointue et stimule la formation de filaments d'actine non branchés dont l'extrémité barbée peut s'allonger librement.

Afin de maintenir un réservoir d'actine monomérique disponible pour la polymérisation, les cellules doivent aussi contrôler la reconstitution rapide du stock d'actine G. Ce renouvellement permanent se fait principalement par le désassemblage de filaments pré-existants (Pollard et Borisy, 2003). Les protéines de la famille des ADF (Actin Depolymerizing Factor)/cofiline sont les principaux facteurs de la dépolymérisation des filaments d'actine (Lappalainen et Drubin, 1997). Ces petites protéines (15 à 22 kDa) sont présentes chez tous les eucaryotes, hautement conservées entre espèces et essentielles dans de nombreux organismes (Ono, 2007). Le mécanisme utilisé par ces protéines pour désassembler les filaments d'actine n'est pas connu précisément mais des données suggèrent qu'elles utiliseraient un processus basé sur la fragmentation des filaments (Andrianantoandro et Pollard, 2006). Chaque coupe de filament d'actine permettrait la création d'une nouvelle extrémité pointue, doublant ainsi l'efficacité de désassemblage du filament total. La nouvelle extrémité barbée créée serait immédiatement bloquée par une protéine de coiffe. Une autre hypothèse avance que l'ADF/cofiline accélérerait de 25 fois la dissociation des sous-unités d'actine aux extrémités pointues (Carlier et al., 1997), mais semble en désaccord avec des résultats plus récents obtenus directement par observation sur filament unique, montrant que les longs filaments d'actine ont tendance à se segmenter en petits filaments en présence d'ADF/cofiline (Pavlov et al., 2007) (Figure 20Ba). Le complexe ADF/cofiline aurait également la possibilité, sans que le mécanisme soit connu, de détacher Arp2/3 présent au niveau des nœuds de branchements de l'actine et ainsi de débrancher le réseau d'actine (Blanchoin et al., 2000 ; Chan et al., 2009) (Figure 20Bb). Un membre de la famille des ADF/cofiline, GMF (Glia Maturation Factor), ciblerait la jonction entre les sous-unités d'actine du filament fille et le complexe Arp2/3, déstabiliserait les points de branchement et inhiberait l'assemblage de nouveaux filaments d'actine (Gandhi et al., 2010 ; Luan et al., 2013 ; Ydenberg et al., 2013).

Afin de maintenir l'intégrité de certaines structures de filaments vis-à-vis de la fragmentation ou du désassemblage, les filaments d'actine peuvent être stabilisés par des

protéines spécifiques interagissant avec l'actine. Une protéine particulièrement impliquée est la tropomyosine, qui se lie sur les côtés des filaments d'actine, empêche leur coupure et réduit la vitesse de dépolymérisation de l'extrémité pointue. La tropomyosine empêche également la formation de branches par le complexe Arp2/3 (Blanchoin et al., 2001). Il existe également des protéines qui connectent des filaments d'actine pré-existants pour les structurer en faisceaux, de géométries et d'élasticité différentes. Cette élaboration de réseaux permet aux cellules d'adapter la réponse mécanique du cytosquelette à leurs besoins (Tseng et al., 2005). En effet, le regroupement de filaments d'actine en câbles permet par exemple de déformer efficacement la membrane plasmique et d'initier la formation de filopodes (Vignjevic et al., 2006) (Figure 20C). Parmi ces protéines, on peut citer la fascine, l' α -actinine, la spectrine, la fimbrine et la filamine. Dans les faisceaux, les filaments d'actine peuvent être orientés de façon parallèle, anti-parallèle, ou mixte, suivant la nature de la protéine qui les relie (Lieleg et al., 2009, Skau et al., 2011). Certaines de ces protéines, comme la fascine et la fimbrine, imposent une courte distance entre les filaments (environ 10 nm) (Klein et al., 2004 ; Sedeh et al., 2010). La filamine et l' α -actinine forment des faisceaux plus lâches (Courson et Rock, 2010 ; Schmoller et al., 2008 ; Washstock et al., 1993). Les faisceaux constitués de filaments d'actine parallèles sont trouvés dans de nombreux contextes cellulaires comme les filopodes et les microvillosités (Revenu et al., 2004 ; Vignjevic et al., 2003 ; Yang et Svitkina, 2011). La plupart du temps, les extrémités barbées des filaments pointent vers la membrane plasmique (Chhabra et Higgs, 2007). L' α -actinine, la fascine et la fimbrine forment des faisceaux parallèles (Bartles, 2000), ainsi que les formines qui peuvent se déplacer de l'extrémité du filament d'actine à ses côtés (Chesarone et al., 2010). Un autre composant trouvé dans les faisceaux d'actine *in vivo* est le complexe Ena/VASP (Trichet et al., 2008). Il pourrait augmenter l'efficacité de la fascine sur la rigidité des faisceaux, expliquant la présence de ces deux protéines dans les filopodes (Suei et al., 2012). Des structures contenant des filaments d'actine anti-parallèles sont nécessaires pour la cytokinèse, processus qui nécessite un anneau d'actine contractile, et la fonction des fibres de stress pendant l'établissement des adhésions entre cellules et de la cellule à la matrice (Burrige et Wittchen, 2013 ; Hotulainen et Lappalainen, 2006 ; Laporte et al., 2012 ; Skau et al., 2011 ; Théry et al., 2006). Ces phénomènes font également intervenir la famille des myosines, protéines motrices se déplaçant le long des filaments d'actine, nécessaires à la contraction (Laporte et al., 2012). La fimbrine et l' α -actinine semblent capables de stabiliser les faisceaux d'actine dans une conformation anti-parallèle (Laporte et al., 2012). Des réseaux contractiles en présence de myosine et de protéines formant des faisceaux d'actine anti-parallèles ont pu être reconstitués

in vitro (Murrell et Gardel, 2012 ; Vogel et al., 2013). L'orientation des filaments d'actine dans le réseau contractile est un déterminant majeur pour le contrôle de l'amplitude de la contraction (Köhler et Bausch, 2012 ; Reymann et al., 2012).

Dans les cellules, la dynamique et l'organisation du cytosquelette d'actine sont également régulées par la famille des protéines Rho GTPase. Cette famille compte plus d'une dizaine de membres, dont Rho, Rac et Cdc42. Elles interviennent dans la signalisation intracellulaire, en activant ou non leurs cibles, et sont elles-mêmes activées par différents signaux extra-cellulaires. Elles existent sous deux formes : la forme active liée au GTP et la forme inactive liée au GDP. Elles contrôlent notamment la formation des fibres de stress (RhoA), la formation de l'anneau contractile nécessaire à la cytokinèse (RhoA), les mouvements de la membrane plasmique au niveau des lamellipodes (Rac et Cdc42), la formation des filopodes (Cdc42) et participent à la réorganisation du réseau d'actine lors de l'endocytose et de l'exocytose. Une des cibles des protéines Rho est le complexe nucléateur Arp2/3, qui va donc pouvoir initier la formation d'un réseau d'actine branché en fonction des besoins de la cellule (pour revue : Welch et Mullins, 2002 ; Wherlock et Mellor, 2002).

Nous allons maintenant aborder la structure et le rôle des microtubules et des filaments d'actine, séparément ou en interaction l'un avec l'autre, dans le cas particulier des neurones.

II- Organisation et fonctions du cytosquelette dans les neurones

Les neurones sont des cellules hautement polarisées et spécialisées. Ils ont pour rôle le traitement de l'information et possèdent donc des caractéristiques qui leur permettent de recevoir et de transmettre un message nerveux. Autour de leur corps cellulaire, des prolongements plus ou moins longs s'étendent, leur permettant de se connecter à des cellules voisines (comme d'autres neurones) ou très éloignées (comme les cellules musculaires). Ces prolongements sont de deux types : les dendrites et l'axone. Ils ont des rôles distincts : les dendrites reçoivent l'information qui est ensuite transmise le long de l'axone, lequel émet le message au neurone ou à la cellule suivante. Lors de la différenciation du neurone, des structures appelées cônes de croissance se développent à l'extrémité des neurites, générant les forces nécessaires à leur élongation (Figure 21). La communication entre neurones s'effectue au niveau de régions spécialisées, les synapses, composées d'un compartiment pré-synaptique (le bouton axonal) et d'un compartiment post-synaptique (petite extension formée à partir du corps de la dendrite, ou épine dendritique) et au niveau desquelles des neurotransmetteurs sont libérés (encart de la figure 21). Les cytosquelettes de microtubule et d'actine occupent une place importante dans le développement, le maintien de la polarisation et les fonctions neuronales (Figure 21).

Pendant longtemps, on a pensé que les deux réseaux de microtubules et d'actine avaient des fonctions bien distinctes : les microtubules seraient impliqués dans le maintien de l'architecture du neurone et le transport de « cargos » (vésicules ou organites) sur de longues distances, donc aurait un rôle plutôt structural, alors que l'actine occuperait une place centrale dans les changements morphologiques associés à l'élongation des neurites, la fonction synaptique et la motilité du neurone. Depuis quelques années, on sait cependant que les microtubules sont également essentiels à la croissance des neurites (Rodriguez et al., 2003) et à la plasticité des synapses (Jaworski et al., 2009) via leur interaction avec l'actine. Dans un premier temps, je décrirai l'organisation et le rôle des microtubules puis des filaments d'actine dans les neurones, puis dans un deuxième temps, l'importance de la coopération entre ces deux cytosquelettes et leur régulation.

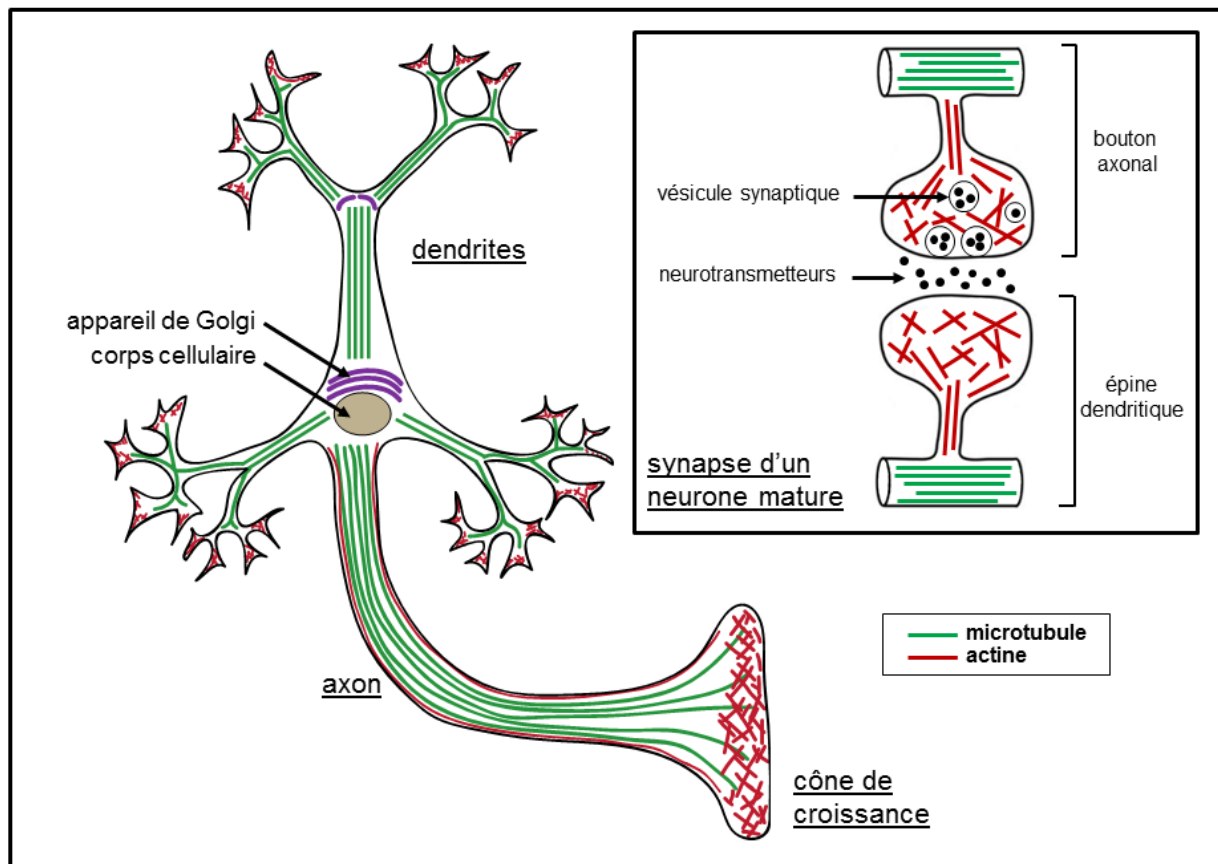


Figure 21. Organisation du cytosquelette de microtubules et d'actine dans un neurone en développement. L'encart montre l'organisation des microtubules et de l'actine dans une synapse d'un neurone mature. Adapté de Conde et Caceres, 2009.

1. Rôle et organisation des microtubules dans le neurone

a) Nucléation des microtubules

Dans les neurones, contrairement à la plupart des autres types cellulaires, les microtubules se détachent du centrosome où ils sont nucléés, et sont ensuite transportés dans les axones à partir du corps cellulaire de façon antérograde (i.e. vers l'extrémité de l'axone) (Ahmad et al., 1998). Pendant ce transport, ils gardent leurs propriétés dynamiques, alternant entre phases de polymérisation et dépolymérisation (Dent et Kalil, 2001). Le sectionnement entre les microtubules et le centrosome se fait par la katanine (Ahmad et al., 1999 ; Karabay et al., 2004 ; Yu et al., 2005). Il a été montré que l'inhibition de l'activité de la katanine entraînait une accumulation des microtubules à proximité du corps cellulaire et donc l'inhibition de la croissance de l'axone (Ahmad et al., 1999). Les microtubules peuvent aussi être transportés de façon rétrograde (i.e. vers le corps cellulaire), ce qui, avec leur dépolymérisation, intervient dans la redistribution rapide des microtubules dans les cas où l'axone doit se rétracter ou former de nouvelles branches (Dent et al., 1999 ; Ahmad et al.,

2000 ; Wang et Brown, 2002). Des études ont montré que les microtubules sont transportés de façon antérograde dans les neurites via la dynéine, moteur moléculaire qui se déplace vers le bout (-) des microtubules. En effet, la dynéine serait ancrée à des protéines de la matrice cellulaire, s'associerait au bout (+) des microtubules à transporter, et, en « marchant » vers leur bout (-), ferait glisser les microtubules vers l'extrémité de l'axone (Dillman et al., 1996 ; Ahmad et al., 1998). Les microtubules neuronaux peuvent également être nucléés de façon acentrosomale dans les dendrites. Cette nucléation à partir de l'appareil de Golgi aurait lieu préférentiellement au cours de la régénération neuronale (Ori-McKenney et al., 2012 ; Song et al., 2012).

b) Organisation des microtubules dans les neurites

Si l'on a vu qu'il y a une redistribution des microtubules au sein de l'axone et des dendrites, la majorité des microtubules du neurone reste stationnaire, organisée sous forme de faisceaux denses. On peut distinguer deux organisations différentes de faisceaux dans les neurites. Dans l'axone, les microtubules sont tous alignés avec une polarité parallèle, leur bout (+) pointant vers le cône de croissance et leur bout (-) vers le corps cellulaire. Dans les dendrites, leur orientation est aléatoire, leur extrémité (+) est soit dirigée vers le corps cellulaire, soit vers l'extrémité distale de la dendrite (Conde et Cáceres, 2009 ; Baas et Lin, 2011) (Figure 22). Cette différence de polarité entre dendrites et axone permet d'établir une différence morphologique et fonctionnelle entre les deux types de prolongements neuronaux, notamment en recrutant spécifiquement des moteurs moléculaires associés à des types de « cargos » particuliers (Black et Baas, 1989 ; Burack et al., 2000). En 1989, Black et Baas ont proposé que les vésicules contenant des protéines spécifiquement dendritiques s'associaient exclusivement aux moteurs moléculaires dirigés vers le bout (-), alors que les vésicules transportant des protéines axonales ne se liaient qu'à des moteurs se déplaçant vers le bout (+) des microtubules. Cependant, il a été montré par la suite que les protéines axonales sont également capables d'être transportées de façon rétrograde (Nakata et al., 1998). Une hypothèse est que les moteurs feraient la distinction entre les microtubules des dendrites et des axones en reconnaissant leurs propriétés biochimiques (Burack et al 2000) et/ou la nature des MAPs qui leur sont associées (Sato-Harada et al., 1996 ; Ebner et al., 1998 ; Trinczek et al., 1999). La kinésine-1, par exemple, s'associe préférentiellement aux microtubules acétylés, modification post-traductionnelle majoritaire des microtubules dans l'axone en développement (Palazzo et al., 2003). Cette reconnaissance permet au domaine moteur de la kinésine-1 de s'accumuler dans le futur axone juste avant la polarisation morphologique du

neurone. D'autre part, le complexe composé d'une chaîne lourde de la kinésine-1, de KIF5C, de KLC1 (Kinesin Light Chain1), et de CRMP2 (Collapsin Response Mediator Protein 2) est impliqué spécifiquement dans le transport dirigé des hétérodimères et des oligomères de tubuline jusqu'au bout de l'axone en croissance (Kimura et al., 2005). CRMP2 est enrichi dans la partie distale de l'axone où il promeut l'assemblage de tubuline au bout des microtubules pré-existants. Le rôle de CRMP2 dans la formation de l'axone montre l'importance du ciblage des moteurs moléculaires au niveau de l'axone (Fukata et al., 2003). Les axones et les dendrites contiennent également différents types de MAPs : dans les neurones matures, MAP2 est majoritairement présente au niveau des dendrites, alors que tau prédomine au niveau de l'axone (Dehmelt et Halpain, 2005). Les microtubules dendritiques et axonaux pourraient aussi se différencier par l'état de phosphorylation de leurs moteurs moléculaires (Lopez et Sheetz, 1993 ; McIlvain et al., 1994 ; Lee et Hollenbeck, 1995 ; Reilein et al., 1998).

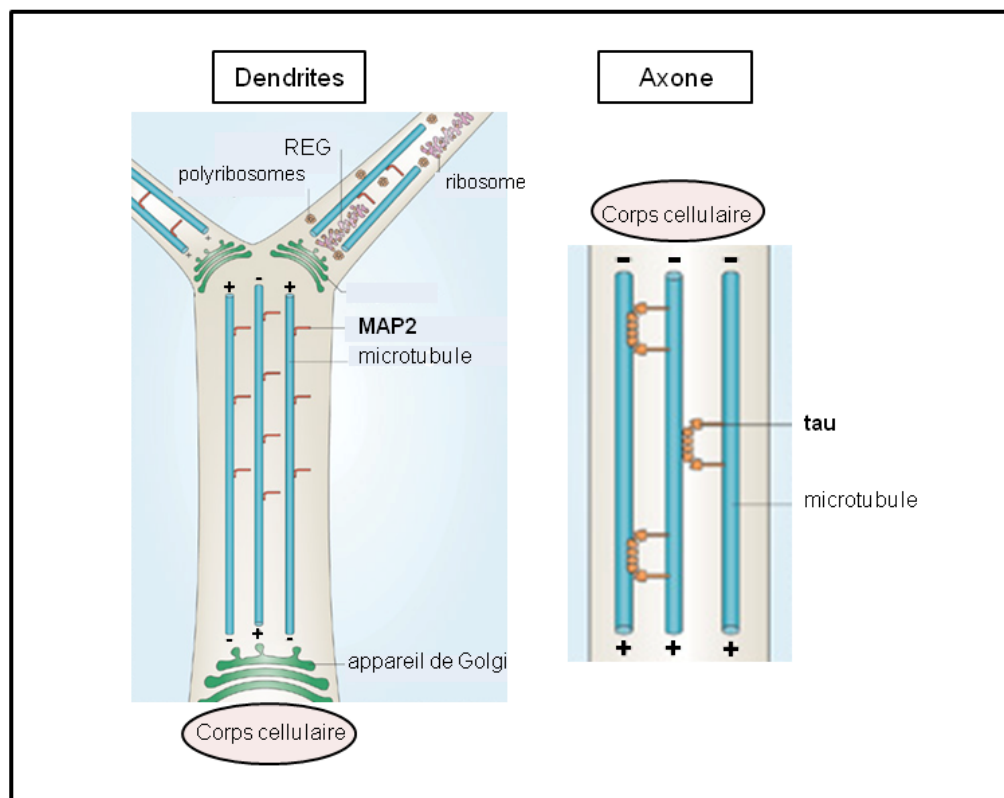


Figure 22. Organisation des microtubules dans l'axone et les dendrites. Les axones contiennent des microtubules associés à tau et d'orientation uniforme, alors que les dendrites contiennent des microtubules associés à MAP2 et d'orientation mixte. Les dendrites contiennent aussi des organelles absentes des axones : REG, appareil de Golgi et polyribosomes (d'après Conde et Caceres, 2009).

Une autre conséquence de la différence d'organisation des microtubules dans les dendrites et l'axone est la taille de ces prolongements. En effet, l'orientation parallèle des

microtubules dans l'axone permettrait de générer des forces de compression qui s'opposeraient à la tension exercée lors de l'allongement de l'axone. Cette force de compression serait plus faible dans les dendrites du fait de l'orientation aléatoire des microtubules (Lafont et al., 1993), d'où un allongement moindre des dendrites.

Les faisceaux de microtubules sont nécessaires à la croissance et au maintien de l'architecture des neurites. Dans l'axone, leur rôle dans le transport de vésicules « cargos » contenant les protéines nécessaires à la transmission du message nerveux est particulièrement important. En effet, contrairement au reste du neurone, l'axone possède une machinerie de synthèse protéique limitée. Les faisceaux de microtubules apparaissent donc comme de solides rails sur lesquels les moteurs moléculaires se déplacent, du corps cellulaire jusqu'à l'extrémité axonale, ce qui représente parfois de longues distances (Hirokawa, 1998). Il a par ailleurs été montré que dans le cas de neurones à longs axones, les faisceaux de microtubules sont impliqués dans le transport d'ARNm utilisés pour la traduction de protéines, notamment la tubuline ou l'actine, au niveau du cône de croissance (Eng et al., 1999). Dans les dendrites, les microtubules permettent entre autres le transport de vésicules entre le réticulum endoplasmique granuleux et l'appareil de Golgi. Les microtubules jouent également un rôle dans le maintien de l'appareil de Golgi des dendrites puisqu'en présence de nocodazole, on retrouve un réseau golgien complètement désorganisé, avec déconnection et dispersion des membranes golgiennes dans tout le cytoplasme (Thyberg et Moskalewski, 1999).

c) Des microtubules de stabilités différentes

On peut également distinguer différentes populations de microtubules dans les neurones, indépendamment du compartiment neuronal où ils se trouvent, mais suivant les modifications post-traductionnelles qu'ils ont subies. Lorsqu'elle est synthétisée, la tubuline α est tyrosinée au niveau de son extrémité C-terminale. Cette tyrosine peut ensuite être clivée par une enzyme, exposant alors un résidu glutamate. Cette tubuline détyrosinée peut subir un autre clivage enzymatique et perdre son glutamate : on parle alors de tubuline $\Delta 2$. La tubuline $\Delta 2$ est une forme de tubuline spécifiquement présente dans les neurones différenciés, aussi bien dans les dendrites que dans les axones. Les microtubules neuronaux contiennent environ 20% de tubuline tyrosinée, 40% de tubuline détyrosinée et 40% de tubuline $\Delta 2$ (Paturle-Lafanechère et al 1994). La détyrosination traduit la durée de vie d'un microtubule : plus un microtubule est détyrosiné, plus le début de sa polymérisation est ancien (Khawaja et al., 1988). La tubuline peut aussi être acétylée, ce qui correspond à l'ajout d'un groupement

acétyle sur la lysine 40. L'acétylation est souvent associée à un état stable du microtubule et à une plus grande résistance aux drogues dépolymérisantes (Paturle-Lafanechère et al., 1994). Dans les faisceaux, les microtubules individuels sont formés de deux formes de tubuline : une population de microtubules est riche en tubuline tyrosinée, et l'autre en tubuline détyrosinée. Dans les neurites, le domaine riche en tubuline tyrosinée s'assemble localement dans l'axone par l'élongation du bout (+) du domaine stable non-tyrosiné. Ce dernier domaine pourrait également servir de support de nucléation pour l'assemblage d'autres microtubules. Dans les axones en croissance, les polymères les plus dynamiques sont tyrosinés et sont concentrés aux extrémités, c'est-à-dire au niveau du cône de croissance, alors que les polymères ayant une durée de vie plus longue, caractérisés par de la tubuline acétylée, se trouvent dans la partie proximale de l'axone (voir Figure 23A). Cette différence de stabilité des microtubules est également due à diverses MAPs qui vont reconnaître un type de modification post-traductionnelle. Par exemple, la kinésine KIF2 (homologue de MCAK) reconnaît et déstabilise spécifiquement les microtubules tyrosinés (Peris et al., 2009).

d) Rôles des microtubules dans la polarisation neuronale

Les microtubules sont essentiels à la polarisation du neurone en développement. Le neurone se polarise quand une de ses neurites accélère sa croissance pour devenir un axone. Dans des neurones non polarisés, la stabilisation des microtubules dans un neurite en particulier suffit à induire l'émergence de l'axone (Witte et al., 2008). Ainsi, si les neurones sont exposés au taxol, composé stabilisant les microtubules, il y a apparition de plusieurs structures apparentées à des axones, contenant un gradient proximo-distal de tau et une absence de MAP2. L'axone et les dendrites en développement possèdent à leur extrémité un cône de croissance, structure motile particulièrement riche en actine nécessaire à leur formation et leur élongation. Le cône de croissance contient une zone en forme d'éventail, le lamellipode, qui présente de nombreuses extensions, les filopodes. Dans le lamellipode, le réseau d'actine est sous la forme d'un réseau dense formant un maillage et, au sein des filopodes, il est sous forme de faisceaux d'actine. Le cône de croissance est composé d'une zone périphérique (zone P), d'une zone centrale (zone C) et d'une zone de transition entre ces deux zones (zone T) (Figure 23).

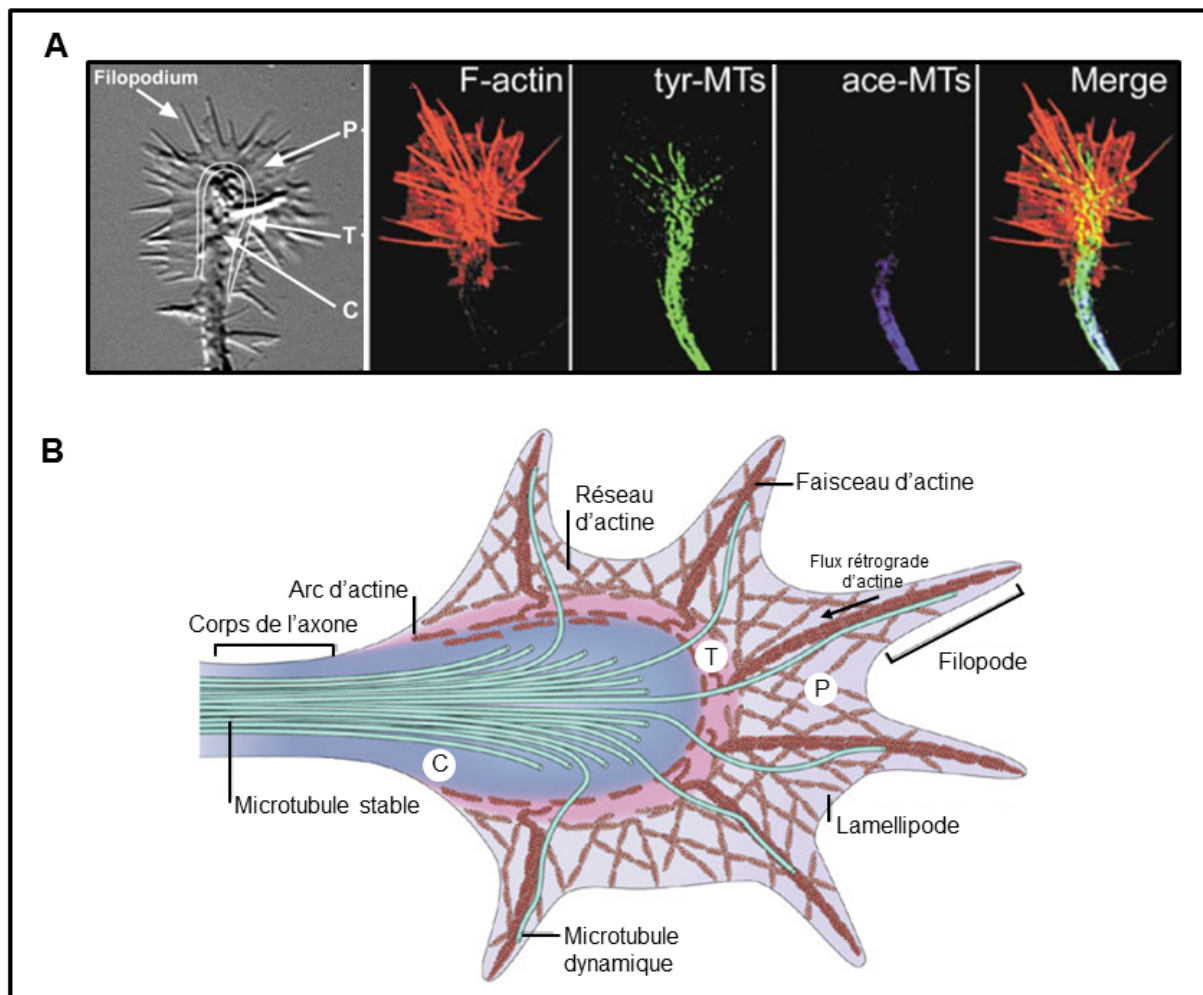


Figure 23. Organisation des cytosquelettes de microtubules et d'actine au sein du cône de croissance. (A) Localisation des filaments d'actine et des microtubules dans un cône de croissance composé de nombreux filopodes, et nature biochimique des microtubules. Les microtubules dynamiques et tyrosinés (tyr-MTs) se dispersent dans la région périphérique (P) et de transition (T) du cône de croissance, alors que les microtubules stables et acétylés (ace-MTs) sont restreints à la zone centrale (C) et au corps de l'axone (adapté de Dent et Gertler, 2003). (B) Représentation schématisée d'un cône de croissance. L'actine est présente sous deux formes principales : en réseau maillé dans les lamellipodes et en faisceaux de filaments parallèles dans les filopodes. Elle est peu présente au niveau du domaine C (adapté de Lowery et Van Vactor, 2009).

Quand les microtubules pénètrent à l'intérieur du cône de croissance, ils se dissocient des faisceaux présents dans l'axone. Ils deviennent alors très dynamiques et adoptent des comportements complexes : ils peuvent s'écarter ou se remettre en faisceaux, se tordre, et s'organiser en boucle (Gordon-Weeks, 2004 ; Geraldo et Gordon-Weeks, 2009). Cette réorganisation des microtubules dans le cône de croissance ainsi que l'alternance entre phases de polymérisation et de dépolymérisation sont nécessaires à l'avancée du cône de croissance, à l'élongation axonale et à la reconnaissance de signaux de guidance (Tanaka et Kirschner, 1991 ; Tanaka et Kirschner, 1995). En effet, l'addition de faibles doses de vinblastine,

alcaloïde qui diminue la dynamique des microtubules, abolit l'élongation axonale (Tanaka et Kirschner, 1995). De plus, l'inhibition de la dynamique des microtubules dans le cône de croissance perturbe le choix de la direction de croissance de l'axone soumis à des facteurs de guidance (Challacombe et Elam, 1997 ; Gordon-Weeks, 2004 ; Geraldo et Gordon-Weeks, 2009). Il a été proposé que la population de microtubules dynamiques qui envahit les lamellipodes du cône de croissance servirait de guide pour les invasions futures de microtubules transportant des organelles, ceux-ci apportant le matériel nécessaire au maintien de l'avancée de l'axone (Tanaka et Kirschner, 1991). Par ailleurs, lorsque l'axone fait une pause et se rétracte, les microtubules adoptent une structure particulière en boucle vers l'arrière du cône de croissance. Si le cône de croissance doit à nouveau avancer, cette boucle peut se casser, libérant des microtubules pouvant être transportés ou servant de base à une nouvelle polymérisation (Roos et al., 2000).

Au fur et à mesure de l'élongation axonale, les microtubules s'organisent progressivement en faisceaux dans le domaine central du cône de croissance, ce qui consolide la partie de l'axone nouvellement formée (Figure 23). Cette fasciculation des microtubules résulte de la coalescence des microtubules écartés grâce à des forces latérales produites par les arcs d'actine sous-membranaires et/ou de l'extension de faisceaux préexistants dans le corps de l'axone. Ce comportement dynamique et spatial des microtubules dans le cône de croissance de l'axone dépend et est coordonné à celui du cytosquelette d'actine. Cette coordination des deux cytosquelettes sera abordée plus loin (voir partie 3 ci-dessous).

Parmi les acteurs protéiques de l'extension des neurites, on trouve plusieurs MAPs structurales. MAP1B et tau ont été les premières protéines identifiées comme impliquées dans la régulation de l'organisation des microtubules et la polarisation neuronale (Caceres et Kosik, 1990 ; Caceres et al., 1992 ; Harada et al., 1994). Ces deux protéines ont des fonctions redondantes mais sont essentielles à la formation de l'axone (Takei et al., 1997). MAP2 est également cruciale pour l'extension des neurites. En effet, son inhibition par des ARN anti-sens maintient la périphérie des cônes de croissances au stade de lamellipodes et inhibe la formation de filopodes. Cela a pour conséquences une réduction du nombre de neurites et les cellules en culture finissent par devenir rondes (Caceres et al., 1992 ; Sharma et al., 1994). Ces études suggèrent que l'établissement initial des neurites dépend de MAP2. La doublecortine est également enrichie aux extrémités des neurites, a un rôle dans la formation des faisceaux de microtubules et dans la croissance de l'axone (Friocourt et al., 2003). La

délétion de DCX chez la souris entraîne la formation d'axones extrêmement branchés (Kappeler et al., 2006). Des études plus récentes ont également montré l'importance des +TIPs dans la croissance et la guidance de l'axone et des dendrites (pour revue : Jaworski et al., 2008). C'est le cas de CLASP, impliqué dans la rétraction de l'axone (Lee et al., 2004), APC, essentiel à une élongation axonale rapide sous l'influence du facteur de croissance neuronale NGF (Zhou et al., 2004), ou encore EB3, nécessaire à la formation du cône de croissance et la neuritogenèse via son interaction avec la drébrine, une protéine qui se lie à l'actine (Geraldo et al., 2008).

Contrairement au comportement des microtubules lors de l'élongation de l'axone et des dendrites, on sait très peu de choses sur la dynamique des microtubules au sein du bouton axonal. Les microtubules joueraient un rôle dans la formation du compartiment pré-synaptique en adoptant une architecture en boucle au sein de laquelle ils seraient sous un état peu dynamique (Roos et al., 2000 ; pour revue : Conde et Cáceres, 2009).

e) Rôles des microtubules dans le compartiment synapto-dendritique

Suite au développement de l'axone, les autres neurites s'allongent et établissent des branchements partant de leur partie principale, ce qui aboutit à la formation d'un arbre dendritique. La protéine MAP1A a été montrée comme ayant un rôle central dans la formation et l'activité des dendrites. Elle est cruciale pour l'extension dendritique puis elle est enrichie dans les dendrites matures et les épines dendritiques, et participe au remodelage des embranchements dendritiques lors de l'activation du neurone (Szebenyi et al., 2005). La déplétion de MAP1A dans des neurones en culture inhibe le branchement dendritique et conduit à la rétraction des dendrites. La protéine MAP2 est essentielle au maintien de l'architecture des dendrites. De plus, bien que la protéine tau soit considérée comme un marqueur axonal, des études récentes l'ont localisée dans les dendrites (Ittner et al., 2010 ; Frandemiche et al., 2014).

D'autre part, des études ont permis de montrer que le transport des microtubules du corps cellulaire vers les dendrites est un processus essentiel dans l'élaboration du réseau dendritique (Sharp et al., 1995). En effet, l'élongation des dendrites est accompagnée d'une diminution du nombre des microtubules à proximité du corps cellulaire. L'orientation mixte des microtubules au sein des dendrites ne vient donc pas, comme il a été supposé, de leur

nucléation à l'extrémité des dendrites puis de leur élongation rétrograde, mais de microtubules nucléés à proximité du corps cellulaire, réorientés (par des mécanismes inconnus) puis transportés vers l'extrémité distale des dendrites. De plus, le transport actif des microtubules est également important pour le maintien de l'orientation des microtubules dans les dendrites au stade mature des neurones, puisque si ce transport est inhibé, les microtubules s'orientent de façon uniforme dans les dendrites et celles-ci acquièrent progressivement les caractéristiques d'un axone (Yu et al., 2000).

Les faisceaux de microtubules contenus dans le corps principal de chaque dendrite jouent, comme dans l'axone, un rôle dans le maintien de l'architecture de la dendrite et dans le transport de vésicules « cargos » d'une extrémité à l'autre du neurone (Conde et Caceres, 2009). Au niveau des épines dendritiques ou compartiments post-synaptiques, le rôle des microtubules a été très peu étudié, puisque les techniques de microscopies classiques à fluorescence ou électroniques n'ont pu pendant longtemps détecter leur présence dans ce compartiment (Kaeck et al., 2001 ; Halpain et al., 2005). Cependant, des études récentes ont révélé la présence transitoire de microtubules dynamiques dans les épines dendritiques de neurones matures (Gu et al., 2008 ; Hu et al., 2008 ; Jaworski et al., 2009), présence fortement augmentée lorsque le neurone est activé (Hu et al., 2008 ; Kapitein et al., 2010). Par ailleurs, l'inhibition spécifique des propriétés dynamiques des microtubules conduit à une réduction du nombre d'épines dendritiques dans les neurones en culture (Jaworski et al., 2009). Une fois dans l'épine, les microtubules moduleraient directement l'organisation du cytosquelette d'actine, via notamment la +TIP EB3, influençant ainsi la morphologie et l'activité de l'épine. L'ensemble de ces résultats montre que l'architecture et la fonction des synapses sont hautement dépendantes des microtubules et de leur interaction avec l'actine (voir partie 3 pour plus de détails). Une hypothèse récente pour expliquer l'entrée des microtubules dans les épines dendritiques est qu'il existerait de petits microtubules circulant librement dans les dendrites et dans l'axone et que, lors de l'activation du neurone, ces petits microtubules pourraient être directement transportés dans les épines pour apporter du matériel nécessaire à l'activité de la synapse (Dent et Baas, 2014).

Il semblerait que tous les microtubules qui pénètrent dans les épines dendritiques aient leur extrémité (+) tournée vers la tête de l'épine (Jaworski et al., 2009). Par conséquent, l'entrée des microtubules dans les épines pourrait faciliter le ciblage à la membrane post-synaptique de vésicules associées à des moteurs moléculaires dirigés vers le bout (+). Ces

vésicules peuvent contenir des récepteurs aux neurotransmetteurs, des canaux ioniques, des protéines de signalisation ou des ARNm. Cependant, le transport de vésicules par les microtubules n'a pas encore pu être visualisé directement dans les épines. Il est également possible que certains moteurs moléculaires destinés à aller aux épines aient plus d'affinité pour les microtubules tyrosinés et dynamiques, permettant ainsi l'adressage spécifique de vésicules aux épines (Hammond et al., 2008). Des changements dans la stabilité des microtubules, concomitants avec des changements dans leurs modifications post-traductionnelles auraient donc le potentiel d'établir des voies spécifiques de transport entre le corps de la dendrite et les épines dendritiques.

En conclusion, les microtubules sont des éléments essentiels du cytosquelette dont la stabilisation, la fragmentation, le transport et l'instabilité dynamique soutiennent les changements morphologiques du neurone durant son développement et sa vie adulte. Leurs propriétés structurales et dynamiques sont finement régulées par les MAPs. Ils ne sont cependant pas les seuls responsables de ces changements morphologiques, puisque le cytosquelette d'actine a également une place essentielle dans les phénomènes d'axogenèse et d'activité de la synapse.

2. Rôle et organisation de l'actine dans le neurone

Dans les neurones, l'actine est impliquée dans la polarisation neuronale, l'élongation des neurites et la stabilisation et le remodelage de la structure des épines dendritiques. L'actine filamenteuse peut exister sous forme de filaments individuels mais, la plupart du temps, les filaments d'actine sont organisés en réseau, facilitant les changements rapides de forme de la cellule ou la résistance à des contraintes mécaniques.

a) Rôle de l'actine dans le cône de croissance

Dans le cône de croissance, le réseau d'actine est sous forme d'un réseau dense en maillage dans le lamellipode et sous forme de faisceaux d'actine au sein des filopodes. Dans ces deux structures, les filaments d'actine sont majoritairement orientés avec leur extrémité barbée vers la membrane et leur extrémité pointue vers le centre du cône de croissance (Lewis et Bridgeman, 1992). L'actine se trouve principalement dans les zones P et T du cône de croissance mais peut également adopter une structure contractile en arc au niveau de la zone T, perpendiculaire aux filopodes (Figure 23).

Le remodelage de l'actine dans le cône de croissance se fait en fonction des signaux chimiques se trouvant dans l'environnement de l'axone. Il a été montré que la polymérisation de l'actine induit la protrusion des filopodes et des lamellipodes nécessaire à l'avancée du cône de croissance. Lorsque les neurones sont exposés à de la cytochalasine B, agent dépolymérisant les filaments d'actine, il y a rétraction des filopodes et arrêt de la croissance axonale (Yamada et al., 1970). Cependant, des études ultérieures ont montré que la dépolymérisation des filaments d'actine n'inhibait pas totalement l'extension de l'axone mais avait surtout des conséquences sur son orientation (Lafont et al., 1993 ; Dent et Kalil, 2001). L'actine est donc essentielle pour maintenir la forme du cône de croissance et pour sa croissance orientée.

Il existe plus de vingt protéines qui s'associent à l'actine-G ou à l'actine-F dans le cône de croissance et qui pourraient donc potentiellement réguler les propriétés structurales et dynamiques de l'actine. Parmi elles, on trouve le complexe ADF/cofiline, fortement présent dans les zones T et C, avec un rôle dans la fragmentation et le recyclage des filaments d'actine. On trouve également l' α -actinine et la fascine, réparties dans la totalité du cône avec un rôle dans la formation des faisceaux ; le complexe Arp2/3 dans les zones T et C, impliqué dans la nucléation des filaments d'actine ; le complexe Ena/VASP concentré à l'extrémité des filopodes et qui inhibe l'action des protéines de coiffe ; la filamine qui est présente dans tout le cône de croissance et permet de stabiliser les filaments d'actine ; et la vinculine, présente de façon ponctuelle et permettant l'ancrage de l'actine à la membrane. Il existe d'autres ABPs observées dans le cône de croissance mais dont les fonctions sur l'actine ne sont pas encore claires (pour revue : Dent et Gertler, 2003 ; Pak et al., 2008).

b) Rôle de l'actine dans la synapse

Les filaments d'actine sont très abondants dans les synapses. Au niveau pré-synaptique, les filaments d'actine sont impliqués dans le maintien et la régulation des vésicules synaptiques contenant les neurotransmetteurs, et dans l'exocytose. Il existe trois ensembles de vésicules différents : les vésicules de réserve, les vésicules qui vont fusionner avec la membrane pré-synaptique au niveau de la zone active de la synapse, et les vésicules à recycler. Les filaments d'actine permettent de bien positionner ces trois catégories de vésicules. C'est en effet la dynamique des filaments d'actine qui va déterminer la place des vésicules, en les faisant circuler ou en les maintenant immobiles (Dillon et Goda, 2005) (Figure 24). L'actine peut s'associer directement à des protéines synaptiques, comme la

synapsine, qui sont fixées à la surface des vésicules de réserve et permettent leur maintien dans le compartiment pré-synaptique (Greengard et al., 1994). L'induction de l'activité neuronale entraîne la phosphorylation de la synapsine, ce qui déstabilise son interaction avec l'actine et libère les vésicules de réserve qui peuvent alors cheminer vers la zone active (Chi et al., 2001).

Dans l'épine dendritique, l'actine se présente sous la forme de faisceaux (ou câbles) d'actine au niveau du cou de l'épine et sous forme de réseau branché dans la tête de l'épine (Landis et Reese, 1983). L'actine est particulièrement enrichie à proximité de la densité post-synaptique où elle joue un rôle important dans l'ancrage des récepteurs à la membrane. Elle interagit en effet avec de nombreuses protéines d'échafaudage, comme PSD-95 (Post-Synaptic Density-95) (Kuriu et al., 2006). L'actine est également impliquée dans la formation, la stabilisation et la motilité des épines dendritiques (Fischer et al., 1998 ; Schubert et al., 2006 ; Sekino et al., 2007).

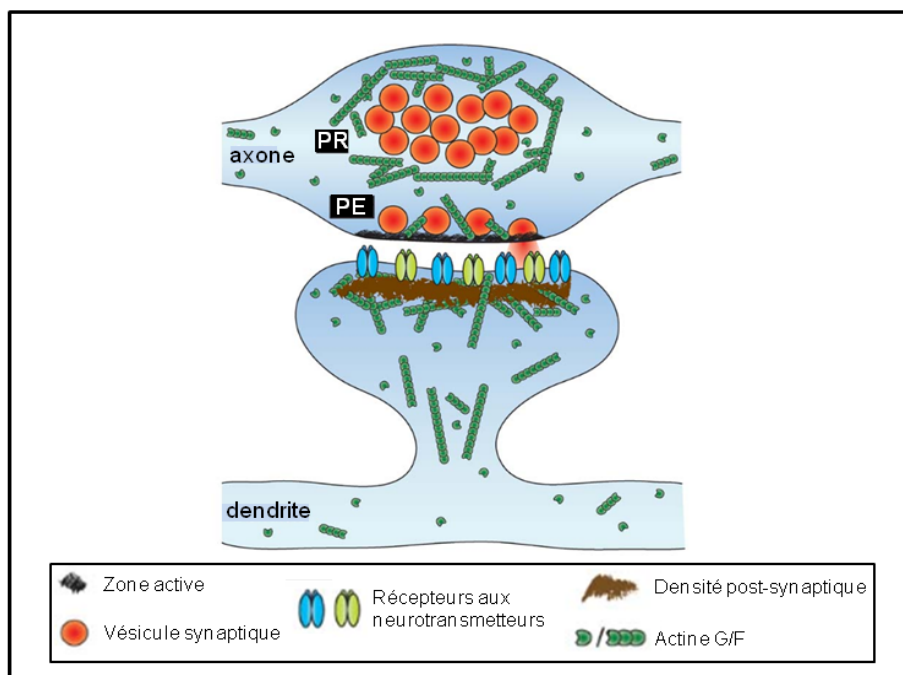


Figure 24. Organisation du cytosquelette d'actine dans la synapse. L'épine dendritique forme, avec le bouton axonal, une synapse. Dans le bouton pré-synaptique, les vésicules synaptiques sont associées à l'actine. Les filaments d'actine entourent le pool de réserve des vésicules (PR) et agissent comme une cage pour le maintenir à sa position. L'actine est également présente dans la zone active qui contient les vésicules destinées à être libérées, appartenant au pool de vésicules exocytées (PE). L'épine dendritique se compose d'un cou et d'une tête. Au sein du cou de l'épine, le réseau d'actine est très condensé sous forme de câbles. Au niveau de la tête de l'épine, les filaments d'actine sont plus dispersés et sont en contact avec la densité post-synaptique, une région riche en protéines importantes pour le fonctionnement de la synapse, comme les récepteurs aux neurotransmetteurs, les canaux ioniques, et des protéines de signalisation (d'après Dillon et Goda, 2005).

Il a été montré qu'une stimulation du neurone à long terme provoque une augmentation de la taille de la tête de l'épine, alors qu'une dépression à long terme va induire un rétrécissement de l'épine (Okamoto et al., 2004). Plus la tête de l'épine est grande, plus l'efficacité synaptique est importante (Matus et al., 2005 ; Kopec et al., 2006 ; Cingolani et Goda, 2008). Ces changements morphologiques sont à l'origine de la plasticité synaptique des neurones, qui permet un renforcement durable ou une perte de la capacité d'une synapse à répondre à un signal donné. On sait maintenant que la structure des épines dendritiques est déterminée par l'organisation du réseau d'actine et que les changements de morphologie et de motilité des épines dendritiques sont associés au cycle de polymérisation et de dépolymérisation du réseau d'actine (Matus, 2000 ; Cingolani et Goda, 2008). Ainsi, l'addition de cytochalasine D, agent de dépolymérisation de l'actine, bloque les mouvements des épines et empêche leurs modifications morphologiques (Fischer et al., 1998). Le phénomène d'élargissement de l'épine lors d'une activation du neurone est donc dû à une augmentation de la polymérisation de l'actine, qui est le plus souvent sous le contrôle des protéines GTPases (Rho, Rac ou Cdc42) (Cingolani et Goda, 2008).

c) Organisation et rôle de l'actine dans l'axone

Une étude récente a montré, grâce à une technique de microscopie à haute résolution (3D-STORM, pour 3 Dimensional-Stochastic Optical Reconstruction Microscopy), que l'actine pouvait adopter une organisation particulière au niveau du corps de l'axone. En effet, elle formerait des anneaux isolés épousant la circonférence de l'axone, espacés de façon régulière tout le long de l'axone (Xu et al., 2013). Cette structure périodique, présente à la fois dans les neurones en développement et matures, n'a pas été observée dans les dendrites. La périodicité de ces anneaux serait d'environ 190 nm. L'étude a également montré que les anneaux d'actine seraient reliés entre eux par la spectrine, une protéine tétramérique fibreuse tapissant la membrane plasmique. De plus, les anneaux d'actine co-localisent avec l'adducine, une protéine de coiffe se liant à l'extrémité barbée des filaments d'actine et facilitant la liaison de l'actine avec la spectrine. Le marquage de l'adducine suit celui des anneaux d'actine sur toute leur circonférence (Figure 25). Il semblerait donc que les anneaux soient formés de petits filaments mis bout à bout et non d'un filament unique. L'axone contiendrait également de longs filaments d'actine s'étendant sur toute la longueur de l'axone mais avec une structure moins régulière que celle des anneaux et moins reproductible entre les neurones. Ces longs filaments seraient en effet trouvés dans des axones particulièrement épais. Les auteurs de cette étude proposent un rôle des anneaux d'actine dans le maintien de la structure longue et fine de

l'axone, en servant, avec la spectrine, de support mécanique à la membrane de l'axone. Ces anneaux pourraient également réguler la périodicité de certaines protéines membranaires, comme par exemple les canaux sodiques, importants pour la génération des potentiels d'action.

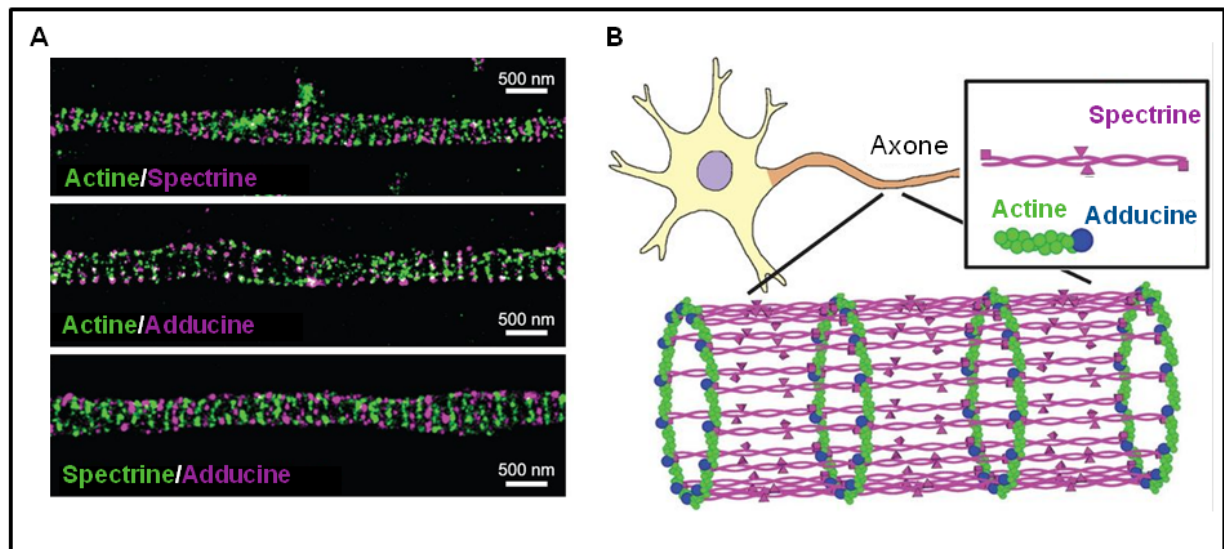


Figure 25. Organisation du réseau d'actine dans l'axone. (A) Immunomarquages de l'actine (en vert), la spectrine (en violet ou vert) et l'adducine (en violet) dans l'axone d'un neurone hippocampal de rat. (B) Modèle de l'organisation de l'actine dans l'axone. De petits filaments d'actine (en vert), coiffés par l'adducine (en bleu) à une de leurs extrémités, s'organisent en anneaux qui suivent la circonférence de l'axone. La spectrine (en violet) connecte les anneaux adjacents d'actine/adducine le long de l'axone avec une périodicité d'environ 190 nm (d'après Xu et al., 2013).

3. Importance des interactions entre microtubules et actine dans le neurone

On a vu précédemment que des études récentes soulignaient le rôle des microtubules dans les processus dynamiques des neurones, comme la migration du cône de croissance ou les changements morphologiques des épines dendritiques. On sait depuis peu que ces phénomènes se font en coopération avec l'actine, les microtubules étant capables d'influencer directement l'organisation et la dynamique du réseau d'actine (pour revue : Hoogenrad et Akhmanova, 2010 ; Gordon-Weeks et Fournier, 2014 ; Kapitein et Hoogenrad, 2015).

a) Rôle de l'interaction entre microtubules et actine dans la morphogenèse neuronale

La coordination des cytosquelettes de microtubules et d'actine est nécessaire aux trois étapes de l'élongation axonale : la protrusion, l'engorgement et la consolidation (Goldberg et Burmeister, 1986 ; pour revue : Dent et Gertler, 2003) (Figure 26). La protrusion correspond à l'extension des lamellipodes et des filopodes due à la polymérisation des filaments d'actine. Ce remodelage du réseau d'actine serait sous contrôle des microtubules dont la polymérisation stimule l'activation de Rac1, un facteur promouvant l'assemblage de l'actine (Wittmann et al., 2003). Durant cette phase, certains microtubules sont également transportés du domaine P vers le domaine C du cône de croissance par couplage avec le flux rétrograde d'actine (Schaefer et al., 2002), ce qui permet un renouvellement continu du cytosquelette microtubulaire. Ensuite, au cours de la phase d'engorgement, les microtubules individuels s'allongent et envahissent les protrusions, en suivant les câbles d'actine dans les filopodes avec lesquels ils interagissent de façon stable (Kabir et al., 2001 ; Schaefer et al., 2002), et transportent avec eux des vésicules membranaires et des organelles (mitochondries, réticulum endoplasmique). Cette interaction microtubules/actine a été mise en évidence à l'aide de drogues désorganisant les faisceaux d'actine et inhibant ainsi l'entrée des microtubules dans les filopodes (Zhou et al., 2002), et a également été directement visualisée par fluorescence (Schaefer et al., 2002 ; Schaefer et al., 2008). L'association et l'alignement des microtubules avec l'actine dans les filopodes sont stabilisés dans la direction d'élongation grâce à la capture des extrémités des microtubules par des protéines liées à l'actine (Gordon-Weeks, 1991 ; Gundersen, 2002). Les protéines candidates impliquées dans cette capture et dans l'association latérale des microtubules avec les filaments d'actine sont décrites ci-dessous (paragraphe c). En parallèle, les microtubules du domaine central avancent dans le domaine de transition, guidés par les arcs d'actine (Lowery et Van Vactor, 2009). Finalement, la consolidation de l'axone intervient lorsque la partie proximale du cône de croissance adopte une forme cylindrique et que les microtubules s'organisent en faisceaux. A ce stade, les filaments d'actine de la périphérie du cône de croissance dépolymérisent, permettant à la membrane de se refermer sur les faisceaux de microtubules.

Le branchement axonal dépend aussi des interactions entre microtubules et actine, puisque la dépolymérisation d'un des polymères diminue le nombre et la longueur des branches de l'axone (Dent et Kalil, 2001).

D'autre part, on peut noter que les filaments d'actine du cône de croissance de l'axone sont plus dynamiques et moins stables que ceux des cônes de croissance au bout des futures dendrites. Cette différence permettrait la protrusion sélective des microtubules, du domaine central vers le domaine périphérique, uniquement dans le cône de croissance de l'axone. Ceci serait dû au fait que les microtubules s'engorgeraient plus facilement dans les filopodes si le réseau d'actine qui les précède est plus lâche (Bradke et Dotti, 1999). Ce phénomène constitue donc un autre élément participant à la différenciation neuronale.

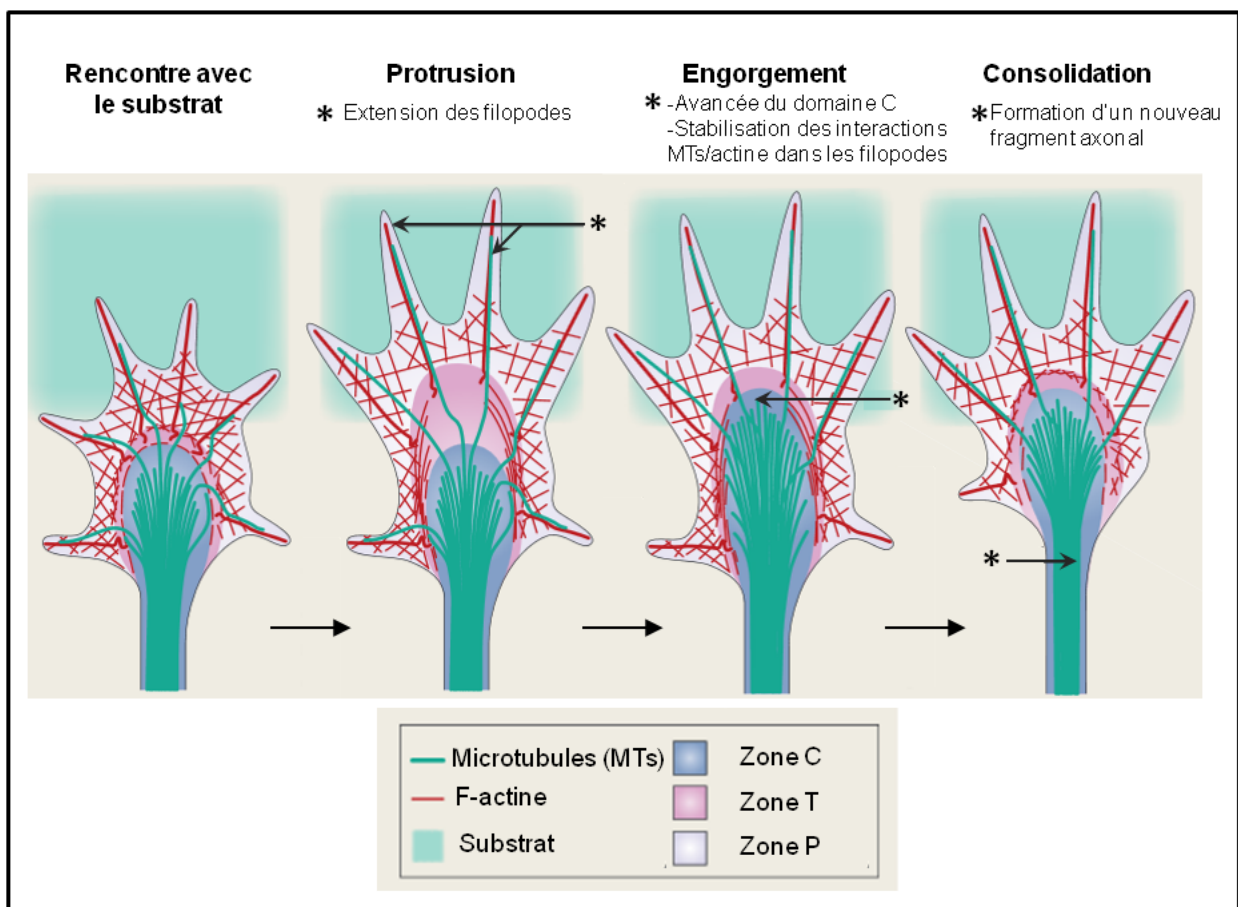


Figure 26. Coordination des microtubules et de l'actine dans les différentes phases de l'élongation axonale. Ce processus a lieu quand le bout de l'axone rencontre des substances attractives ou répulsives. Trois étapes dans la croissance de l'axone ont été décrites. Durant la phase de protrusion, il y a extension rapide des lamellipodes et des filopodes. Ces extensions sont composées d'un réseau d'actine sous forme de mailles et de faisceaux. Ensuite, il y a engorgement quand les microtubules s'avancent dans la zone centrale du cône de croissance, pénètrent dans les filopodes et y amènent des vésicules membranaires et des organelles. La dernière étape est la consolidation, qui correspond à la mise en faisceaux des microtubules, à une dépolymérisation importante d'actine au niveau du cou du cône de croissance et à la formation d'une nouvelle structure cylindrique (d'après Lowery et Van Vactor, 2009).

b) Rôle de l'interaction entre microtubules et actine dans les épines dendritiques

Comme dans les cônes de croissance des neurones en développement, la dynamique de l'actine joue un rôle fondamental dans la formation, le maintien, l'activité et la plasticité des épines dendritiques (Tada et Sheng, 2006). Pendant longtemps, on a pensé que les microtubules étaient restreints à la partie principale de la dendrite et étaient absents des épines dendritiques. Récemment, par imagerie directe des microtubules et de +TIPs dans des neurones matures d'hippocampe, il a été découvert qu'une population de microtubules très dynamiques pouvait entrer transitoirement dans les épines en partant du corps de la dendrite et remodeler l'actine (Hu et al., 2008 ; Jaworski et al., 2009) (Figure 27). Cela suggère que les neurones matures pourraient utiliser les propriétés dynamiques des microtubules pour garder les épines dendritiques plastiques et leur permettre de réagir rapidement aux stimulations du neurone. On sait que la +TIP EB3 est un régulateur majeur de la plasticité synaptique car elle influence, grâce à son association avec des facteurs de liaison à l'actine (comme la cortactine), la dynamique de l'actine au sein de l'épine dendritique (Jaworski et al., 2009). La caractérisation des autres +TIPs et effecteurs impliqués dans la coordination microtubules/actine au sein des épines est un domaine d'étude en émergence et sera détaillée dans le paragraphe suivant.

On ne connaît pas encore les mécanismes par lesquels les microtubules entrent dans les épines. Il est possible que les microtubules soient guidés par d'autres microtubules préexistants dans l'épine ou par les filaments d'actine. En effet, les microtubules pourraient être guidés par les faisceaux d'actine présents au niveau du cou des épines, comme les microtubules du cône de croissance sont dirigés par les câbles d'actine au niveau des filopodes. La densité post-synaptique (amas de protéines associées à la membrane post-synaptique) est également connue pour servir d'ancrage aux faisceaux d'actine, pouvant permettre aux microtubules de se hisser jusqu'à elle (Sheng et Hoogenraad, 2007). De plus, l'interaction entre des +TIPs ou des moteurs moléculaires spécifiques des microtubules et des protéines structurant l'actine des épines pourrait permettre de maintenir les microtubules au sein des épines (Kneussel et Loebrich, 2007 ; Schlager et Hoogenraad, 2009).

En conclusion, les réarrangements de l'actine sont importants pour modifier la structure de la synapse localement, notamment au cours des processus de plasticité synaptique. L'entrée des microtubules dans les épines fournit un mécanisme expliquant

pourquoi les synapses peuvent rester stables sur une longue période, tout en restant prêtes à être restructurées. Le caractère rapide et transitoire de la présence des microtubules, sous le contrôle notamment des MAPs, permettrait en effet à l'épine dendritique d'adapter rapidement sa morphologie aux conditions environnantes du neurone.

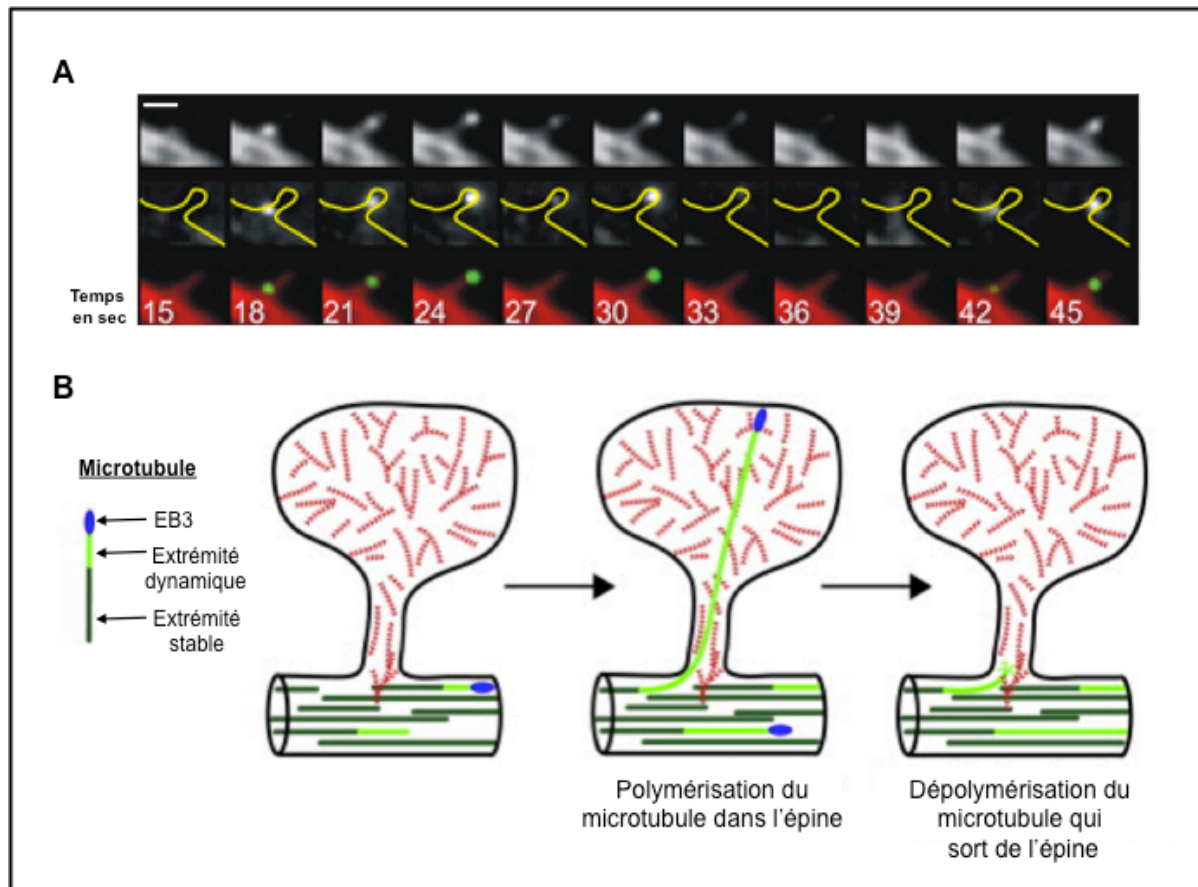


Figure 27. Entrée transitoire des microtubules dans les épines dendritiques. (A) Suivi au cours du temps de l'entrée de EB3-GFP dans les épines de neurones en culture. Un microtubule s'allonge dans l'épine puis se rétracte et sort de l'épine. Barre d'échelle : 1 μ m (tiré de Jaworski et al., 2009). (B) Modèle montrant un microtubule polymérisant et dépolymérisant au sein d'une épine (d'après Dent et al., 2011).

c) Effecteurs connus et potentiels de l'interaction entre microtubules et actine dans les neurones

Un des challenges actuels est d'identifier les protéines impliquées dans la polarité neuronale et l'activité synaptique qui établissent un lien entre les microtubules et les filaments d'actine.

On peut distinguer deux types d'interactions entre les microtubules et l'actine : les interactions de régulation et les interactions structurales. Les interactions de régulation sont

celles avec lesquelles chaque système contrôle l'autre système de façon indirecte, via des cascades de signalisation. La famille des Rho GTPases joue un rôle central dans ces voies de signalisation. Elles sont capables de réguler à la fois les microtubules et l'actine (Wittmann et Waterman-Storer, 2001). Par exemple, un membre de cette famille, RhoA, induit la formation de structures contractiles d'actine, comme les fibres de stress (Etienne-Manneville et Hall 2002), et, en même temps, promeut la stabilisation des microtubules détyrosinés (Cook et al., 1998). Deux facteurs sont connus pour fonctionner en aval de RhoA : la kinase Rho, qui augmente la phosphorylation de la chaîne légère de la myosine-2 et permet ainsi la contractilité de l'actine (Ridley, 2001), et la formine mDia, qui promeut l'assemblage des filaments d'actine et leur organisation en faisceaux (Pruyne et al., 2002) et régule aussi la stabilisation des microtubules (Palazzo et al., 2001). De la même façon, l'activité de Rac1 régule à la fois la polymérisation de l'actine et des microtubules, et joue un rôle dans la protrusion des lamellipodes (Wittmann et al., 2003). Rac1 contrôle l'actine via le complexe protéique Scar/WASP qui active Arp2/3, et via la kinase Pak1 qui est impliquée dans la phosphorylation du complexe ADF/cofiline. Rac1 régule donc la structure du réseau d'actine et le recyclage de l'actine au niveau des lamellipodes (Ridley, 2001 ; Small et al., 2002 ; Wittmann et al., 2003). Quand Pak1 est activée, elle stimule également la polymérisation des microtubules, probablement en inhibant Op18/stathmine, protéine qui déstabilise les microtubules (Daub et al., 2001). L'activité des protéines Rho GTPases est elle-même régulée en amont par les microtubules et l'actine. En effet, le désassemblage des microtubules ou des filaments d'actine active RhoA (Ren et al., 1999), alors que l'assemblage des microtubules active Rac1 (Waterman-Storer et al., 1999) (Figure 28A). La dépolymérisation des microtubules pourrait libérer un facteur échangeur de GTP lié aux microtubules (GEF, pour Guanine nucleotide- Exchange Factor), GEF-H1. Ce facteur permettrait d'activer localement la protéine RhoA en remplaçant son GDP par une molécule de GTP (Krendel et al., 2002). Le mécanisme par lequel la polymérisation des microtubules active Rac1 est inconnu.

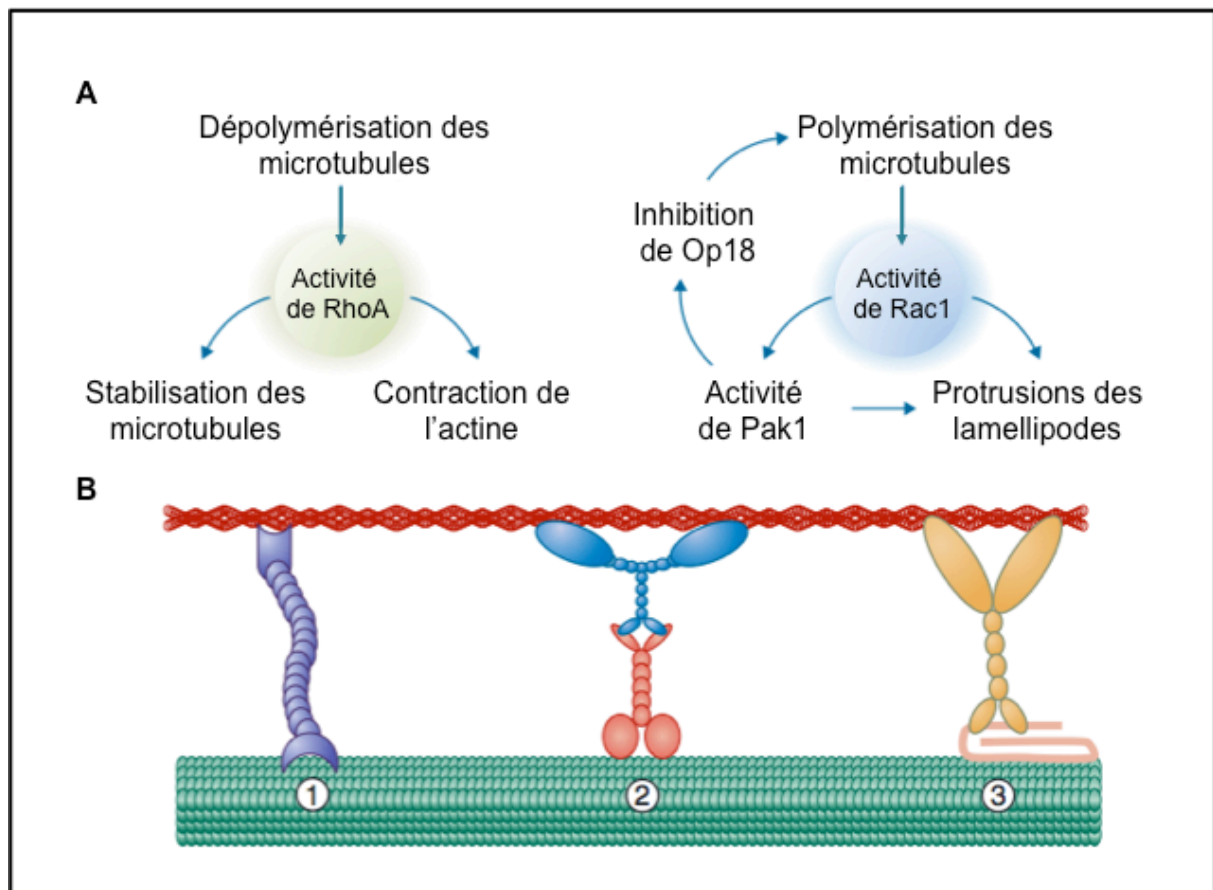


Figure 28. Interactions de régulation ou structurales en les microtubules et l'actine. (A) Les Rho GTPases et les filaments du cytosquelette peuvent se réguler mutuellement. L'état de polymérisation des microtubules a une influence via ces protéines sur l'état du réseau d'actine. (B) Des interactions statiques ou dynamiques peuvent s'établir entre les microtubules (en vert) et les filaments d'actine (en rouge). L'interaction n°1 montre une protéine qui possède à la fois un domaine de liaison aux microtubules et un domaine de liaison à l'actine, et peut représenter un « pont » statique entre les deux polymères. L'interaction n°2 montre un complexe entre un moteur qui se lie à l'actine, par exemple la myosine V (en bleu), et un moteur qui se lie aux microtubules, par exemple une kinésine (en orange). L'interaction n°3 montre un complexe entre une protéine motrice, comme la myosine VI (en jaune), et une protéine qui se lie aux microtubules, comme CLIP-190 (en rose). D'après Rodriguez et al., 2003.

Les interactions structurales sont celles qui lient physiquement les microtubules et l'actine (Figure 28B). On peut distinguer des interactions structurales statiques et dynamiques. Les interactions statiques peuvent être établies par des complexes entre microtubules et actine, ou par des protéines individuelles qui possèdent au moins un site de liaison à l'actine et au moins un site de liaison aux microtubules. S'il s'agit d'une interaction dynamique, les deux polymères bougent l'un par rapport à l'autre. Ce type d'interaction peut faire intervenir des protéines motrices se liant aux microtubules ou à l'actine.

Un enjeu à l'heure actuelle est d'identifier ces liens structuraux entre microtubules et actine. Plusieurs protéines candidates contiennent des domaines pouvant se lier aux microtubules et à l'actine, les deux présentant souvent une forte homologie entre eux (Rodriguez et al., 2003 ; Dehmelt et Halpain, 2004). Pour la plupart des protéines suspectées, une analyse rigoureuse sur leur capacité à lier les microtubules et l'actine simultanément n'a pas été menée. Un obstacle vient du fait que de telles interactions sont difficiles à visualiser dans les cellules, sans doute en raison de leur caractère transitoire et dynamique. De plus, dans les zones d'intérêt telles que le cône de croissance ou les épines dendritiques, les réseaux de microtubules et d'actine sont très denses et il est donc difficile de différencier un co-alignement spécifique d'un co-alignement aléatoire. Une preuve de l'interaction structurale entre microtubules et actine *in vivo* vient d'études d'imagerie dans les cellules, qui révèlent le transport simultané de microtubules et de filaments d'actine à la même vitesse et suivant la même trajectoire, impliquant l'existence de liens stables entre les deux types de filaments (Salmon et al., 2002 ; Schaefer et al., 2002 ; Mandato et Bement, 2003). Ce co-transport de microtubules et d'actine a également été mis en évidence *in vitro*, dans un système où des moteurs moléculaires liant les microtubules étaient attachés à la lame. Les microtubules se déplaçant sur la lame transportaient avec eux des faisceaux d'actine en présence de facteurs cytosoliques (Waterman-Storer et al., 2000).

Dans les neurones, certaines des protéines candidates pouvant établir un lien structural entre microtubules et actine sont les MAPs structurales comme MAP2C, tau, ou la doublecortine (Cunningham et al., 1997 ; Ozer et Halpain, 2000 ; Dehmelt et Halpain, 2004) (voir Figure 29 pour plus d'exemples). En effet, elles sont toutes capables de se lier à l'actine et aux microtubules séparément (voir partie I/1.e) de cette introduction). Il y a plus de trente ans, Griffith et Pollard proposaient que MAP2 et tau pouvaient établir un lien entre les microtubules et l'actine *in vitro* (Griffith et Pollard, 1982), mais l'activité de ces deux protéines dans cette double interaction n'a pas pu être clairement démontrée. MAP2C se lie à l'actine *in vitro* (Roger et al., 2004) et des études en cellules montrent que sa phosphorylation permet de réguler sa localisation différentielle sur les microtubules et sur l'actine (Ozer et Halpain, 2000). L'isoforme MAP2A serait également capable de se lier aux filaments d'actine par les mêmes domaines que ceux interagissant avec les microtubules (Sattilaro, 1986). MAP1A a également été montrée comme interagissant avec l'actine-G et l'actine-F et organisant les filaments d'actine en faisceaux *in vitro* (Pedrotti et al., 1994a ; Pedrotti et al., 1994b). Une étude suggère qu'elle pourrait lier les microtubules et l'actine en même temps

(Asai et al., 1985). MAP1B, sous sa forme non phosphorylée, s'associe également à l'actine polymérisée (Pedrotti et Islam, 1996). La protéine tau est également capable d'interagir directement avec les filaments d'actine, bien que cette propriété ait été controversée (Roger et al., 2004), et a été montrée récemment comme se relocalisant dans les épines dendritiques sous activation neuronale où elle modulerait l'organisation du cytosquelette d'actine (Frandemiche et al., 2014). Ainsi, dans l'hypothèse où tau est capable de se lier à la fois aux microtubules et à l'actine, on peut imaginer qu'elle puisse relier les microtubules le long des faisceaux d'actine dans les épines. La doublecortine a été montrée *in vitro* comme pouvant établir un lien direct entre les microtubules et les filaments d'actine (Tsukada et al., 2005). Elle est enrichie aux extrémités des neurites en croissance, et a été montrée comme impliquée dans la formation de l'axone (Friocourt et al., 2003). Par ailleurs, elle interagit avec la spinophiline, une protéine qui est associée à l'actine et peut organiser les filaments d'actine en faisceaux. La spinophiline peut aussi recruter la protéine phosphatase 1 (PP1) au niveau de la zone de transition du cône de croissance, où elle va déphosphoryler la doublecortine pour l'activer (Bielas et al., 2007). Il a été proposé que la doublecortine, la spinophiline et PP1 forment un complexe impliqué dans la phase de transition entre les microtubules sous forme individuels et en faisceaux, et donc impliqué dans la phase de consolidation de la croissance de l'axone.

La fodrine est une protéine neuronale initialement connue pour organiser les filaments d'actine en faisceaux (Bennett et al., 1982). Une étude a montré qu'elle pouvait également se lier aux microtubules et les ordonner en faisceaux (Ishikawa et al., 1983), elle pourrait donc potentiellement lier à la fois les microtubules et l'actine. La protéine Caldesmon interagit avec l'actine et une étude a montré que sa forme neuronale se liait aussi aux microtubules *in vitro*, pour des concentrations faibles en Ca^{2+} et calmoduline (Ishikawa et al., 1992). Elle pourrait donc intervenir dans les interactions microtubules/actine dans les neurones.

La famille des spectraplakines joue aussi un rôle important dans la coordination entre microtubules et actine (Suozzi et al., 2012). Les membres de cette famille, dont ACF7/MACF1 (Actin Cross-linker Factor 7/Microtubule and ACTin Cross-linker Factor 1/), se lient directement aux microtubules et à l'actine (Leung et al., 1999 ; Kodama et al., 2003). Elles s'associent à l'actine via leur domaine N-terminal et possède un domaine de liaison aux microtubules au niveau de leur extrémité C-terminale. Les spectraplakines n'ont pas d'effet direct sur la dynamique des microtubules (Suozzi et al., 2012). Il a également été montré que Kakapo/Short stop, l'homologue chez la drosophile de MACF, est nécessaire à l'extension de

l'axone, et que cette fonction dépend de ses domaines de liaison à l'actine et aux microtubules (Lee et Kolodziej, 2002). Les auteurs proposent qu'elle établit un lien direct entre les microtubules et le filament d'actine.

Les +TIPs ont également un rôle important dans la coordination entre les microtubules et l'actine (pour revue : Akhmanova et Hoogenraad, 2005 ; Akhmanova et Steinmetz, 2008). Récemment, il a été montré que la liaison de la drébrine, une protéine associée aux filaments d'actine, avec EB3 au bout des microtubules est importante pour la neuritogenèse (Geraldo et al., 2008). Des études de migration cellulaire et de guidance axonale révèlent que plusieurs protéines localisées dans le cône de croissance sont impliquées dans des complexes faisant le lien entre microtubules et actine, comme LIS1, CLASP (Orbit/MAST chez le Xénope), APC et NAV (Neuron Navigator) (Zhou et al., 2004 ; Lee et al., 2004 ; Kholmanskikh et al., 2006 ; Martinez-Lopez et al., 2005). Une étude récente a montré que la +TIP NAV1 interagit avec le GEF de Rho, nommé TRIO, qui permet d'activer la Rho GTPase Rac1 et réguler la dynamique de l'actine (van Haren et al., 2014). Ces interactions entre +TIP et GEF permettent un développement neuritique normal et orienté. La protéine APC est également une candidate pouvant intervenir dans la coopération entre microtubules et actine, notamment en activant Rac1 dans les protrusions cellulaires, ce qui stimulerait la formation des lamellipodes et la migration cellulaire (Kawasaki et al., 2000 ; Kawasaki et al., 2003). Un autre candidat intéressant est IQGAP1, qui s'associe à Rac1, Cdc42 et à l'actine. CLIP-170 induit son association avec l'extrémité (+) des microtubules. L'inhibition de l'interaction entre IQGAP1, Rac1 et Cdc42 conduit à une délocalisation de la protrusion des lamellipodes (Fukata et al., 2002). Les +TIPs permettent donc de former des complexes aux bouts (+) des microtubules impliqués dans l'interaction avec l'actine.

Au niveau des épines dendritiques, on sait que la +TIP EB3 est un régulateur majeur de la plasticité synaptique car elle influence la dynamique du réseau d'actine contenue dans les épines. EB3 est capable de se lier directement à la protéine p140Cap, localisée au niveau de la densité post-synaptique et inhibiteur de la kinase Src. La p140Cap se lie aussi à la cortactine, protéine qui active le complexe Arp2/3 et stabilise le réseau branché d'actine dans les épines. L'interaction entre EB3 et p140Cap doit donc contrôler la fonction de la cortactine et réguler la morphologie des épines et la plasticité synaptique (Jaworski et al., 2009). La taille et l'efficacité des synapses sont donc contrôlées indirectement par l'entrée des microtubules dans les épines dendritiques.

Le tableau de la figure 29 fournit une liste non-exhaustive des protéines candidates permettant une interaction structurale entre les microtubules et l'actine dans les neurones.

Protéine	Localisation ou association	Fonctions	Références
APC	Aux bouts des microtubules et le long des filaments d'actine.	Promeut la polymérisation et la stabilisation des microtubules. Se lie à EB1 et à Asef, le GEF de Rac1. Impliqué dans les interactions entre les extrémités des microtubules et l'actine du cortex cellulaire.	Nathke et al, 1996 Kawasaki et al, 2000 Kawasaki et al, 2003 Barth et al, 2002 Mimori-Kiyosue et al, 2000
MAP1A MAP1B	Sur la paroi des microtubules.	Nucléent et stabilisent les microtubules. MAP1A lie l'actine-G et organise les filaments d'actine en faisceaux. MAP1B se lie à l'actine polymérisée.	Pedrotti et al, 1994a Pedrotti et al, 1994b Pedrotti et Islam, 1996
MAP2A MAP2C	Sur la paroi des microtubules. La phosphorylation de MAP2C lui permet d'interagir avec l'actine.	Elles stimulent l'assemblage et la stabilisation des microtubules. MAP2A se lie aux filaments d'actine, MAP2C organise l'actine en faisceaux.	Satillaro et al, 1986 Ozer et Halpain, 2000 Cunningham et al, 1997
Tau	Sur la paroi des microtubules et sur l'actine.	Promeut l'assemblage, la stabilisation et l'organisation en faisceaux des microtubules. Interagit avec l'actine.	Himmler et al, 1989 Scott et al, 1992 He et al, 2009
DCX	Le long des microtubules et de l'actine.	Stabilise les microtubules. Etablit un lien direct entre microtubules et actine <i>in vitro</i> .	Tsukada et al, 2005
Complexe MyoVa-kinésine	La Myo5a et la kinésine interagissent en double hybride chez la levure.	Interaction dynamique qui peut faire glisser un filament par rapport à l'autre.	Huang et al, 1999
Complexe MyoVI-D-CLIP190	Myo6 et CLIP190 co-localisent dans le système nerveux des embryons.	Le complexe pourrait établir un lien dynamique entre microtubules et actine. Myo6 est impliquée dans le remodelage de la membrane durant l'embryogenèse et la spermatogenèse.	Lantz et Miller, 1998 Hicks et al, 1999

Protéine	Localisation ou association	Fonctions	Références
BPAG1a	Le long et aux bouts des microtubules et sur l'actine.	S'associe à EB1. Possède des domaines de liaison aux microtubules et à l'actine. Rôle dans le maintien de l'intégrité des neurones.	Leung et al, 2002
ACF7/MACF (Kakapo/short stop)	Aux bouts des microtubules et se lie à l'actine.	Rôle dans l'avancée de l'axone, stabilise les microtubules, rôle dans l'interaction microtubules/actine à la périphérie de la cellule.	Leung et al, 2002
Plectine	Localisée au niveau des fibres de stress.	Relie les filaments intermédiaires aux microtubules et à l'actine. Rôle dans la régulation de l'organisation de l'actine et dans le maintien de l'intégrité des tissus.	Wiche, 1998
CLASP	Aux bouts (+) des microtubules, au niveau des cônes de croissance.	Partenaires potentiels de protéines remodelant l'actine. La tyrosine kinase Ablson pourrait être un intermédiaire entre CLASP et l'actine.	Lee et al, 2004
NAV1	Aux bouts (+) des microtubules.	Interagit avec TRIO, le GEF de Rho et module ainsi la structure du réseau d'actine.	Martinez-Lopez et al, 2005 Van Haren et al, 2009 Van Haren et al, 2014
LIS1	Le long des microtubules.	Promeut l'assemblage des microtubules en réduisant le nombre de catastrophes. Interagit avec CLIP-170, active Cdc42 via son interaction avec IQGAP1, une protéine structurant l'actine. Cette interaction permet de maintenir les bouts (+) des microtubules en contact avec l'actine, favorisant la motilité neuronale.	Sapir et al, 1997 Kholmanskikh et al, 2006
Fodrine	Sur l'actine et les microtubules.	Organise les filaments d'actine en faisceaux et interagit avec les microtubules.	Bennett et al, 1982 Ishikawa et al, 1983
Caldesmon	Sur l'actine et les microtubules.	Organise l'actine en faisceaux. Pourrait faire un lien entre microtubules et actine pour de faibles concentrations en Ca^{2+} et calmoduline <i>in vitro</i> .	Ishikawa et al, 1992a Ishikawa et al, 1992b

Figure 29. Protéines neuronales candidates aux interactions structurales entre les microtubules et les filaments d'actine. Adapté de Rodriguez et al., 2003.

III- Tau, un acteur de l'organisation des microtubules et de l'actine

Tau est une protéine appartenant à la famille des MAPs. Ses fonctions les plus connues sont de réguler la dynamique des microtubules et de les organiser en faisceaux. Elle a été découverte en 1975 par Weingarten et Lockwood et a été initialement caractérisée pour son activité à promouvoir la nucléation des microtubules. Elle est alors décrite comme « Tubulin Associated Unit ». Chez l'humain, tau est majoritairement exprimée dans les neurones. Elle joue un rôle essentiel dans le transport axonal et dans la croissance neuritique durant la différenciation du neurone (Drubin et Kirschner, 1986). Ses fonctions neuronales semblent toutefois être redondantes avec celles de MAP1B (Takei et al., 2000), bien que des neurones en culture de souris invalidées génétiquement pour tau présentent des prolongements neuritiques plus petits que chez les souris sauvages (Dawson et al., 2001). Tau est principalement localisée dans le compartiment axonal mais peut également être trouvée au niveau somato-dendritique ou dans le noyau (Ittner et al., 2010 ; Morris et al., 2011 ; Frandemiche et al., 2014). Il apparaît depuis quelques années que tau est en fait une protéine aux multiples fonctions, puisqu'elle peut interagir avec de nombreux éléments de la cellule autres que les microtubules. De plus, tau joue un rôle déterminant dans un groupe de pathologie neurodégénératives appelées tauopathies, dont fait partie la maladie d'Alzheimer. Depuis 1975, tau a fait l'objet de très nombreuses études mais les mécanismes qui régissent son activité sur les microtubules et dans les maladies ne sont pas encore décrits de façon claire.

1- Epissage, isoformes et structure de tau

Le gène codant pour la protéine tau est situé sur le chromosome 17, au locus 17q21 (Neve et al., 1986). Il est principalement exprimé dans les neurones mais aussi, de façon moindre, dans les oligodendrocytes (LoPresti et al., 1995 ; Müller et al., 1997) et dans certains tissus périphériques tels que le cœur, les reins, les muscles, les poumons et les testicules (Gu et al., 1996). L'ARNm du gène de tau comporte 16 exons s'étendant sur 140 kb (Andreadis et al., 1992). Il subit un épissage alternatif complexe, régulé au cours du développement et en fonction du type cellulaire (Goedert et al., 1989 ; Andreadis, 2005). Les exons 1, 4, 5, 7, 9, 11, 12 et 13 sont exprimés de façon constitutive. Les exons 2, 3, 4A, 6, 8 et 10 sont soumis à un épissage alternatif. Les exons -1 et 14 ne sont jamais traduits. Dans le système nerveux central, les exons 4A et 8 sont toujours exclus alors que dans le système nerveux périphérique la traduction de l'exon 4A donne naissance à l'isoforme de tau la plus longue,

appelée « Big tau » (Georgieff et al., 1993). De façon intéressante, les microtubules des neurones contenant cette « Big tau » sont plus espacés au sein des faisceaux (Chen et al., 1992 ; Frappier et al., 1994). L'exon 6 est traduit dans le système nerveux périphérique uniquement au stade fœtal puis seulement dans le cervelet et le prosencéphale adultes et dans les muscles juvéniles et adultes (Luo et al., 2004). L'inclusion de cet exon 6 permet à un codon STOP d'être traduit et conduit à l'expression d'une protéine tronquée ne contenant pas le domaine de liaison aux microtubules. La présence de cette protéine dans les neurones inhibe la croissance neuritique. Au niveau fœtal, elle agirait comme un agent de retardement de la nucléation des microtubules (Wei et Andreadis, 1998). Dans le système nerveux central humain, l'épissage alternatif des exons 2, 3 et 10 donne naissance à six isoformes de tau : tau0N3R (exclusion de l'exon 2 (2-), 3-, 10-), tau1N3R (inclusion de l'exon 2 (2+), 3-, 10-), tau2N3R (2+, 3+, 10-), tau0N4R (2-, 3-, 10+), 1N4R (2+, 3-, 10+) et tau2N4R (2+, 3+, 10+). L'inclusion de l'exon 2 est indépendante de celle de l'exon 3, mais pas l'inverse (Andreadis et al., 1992).

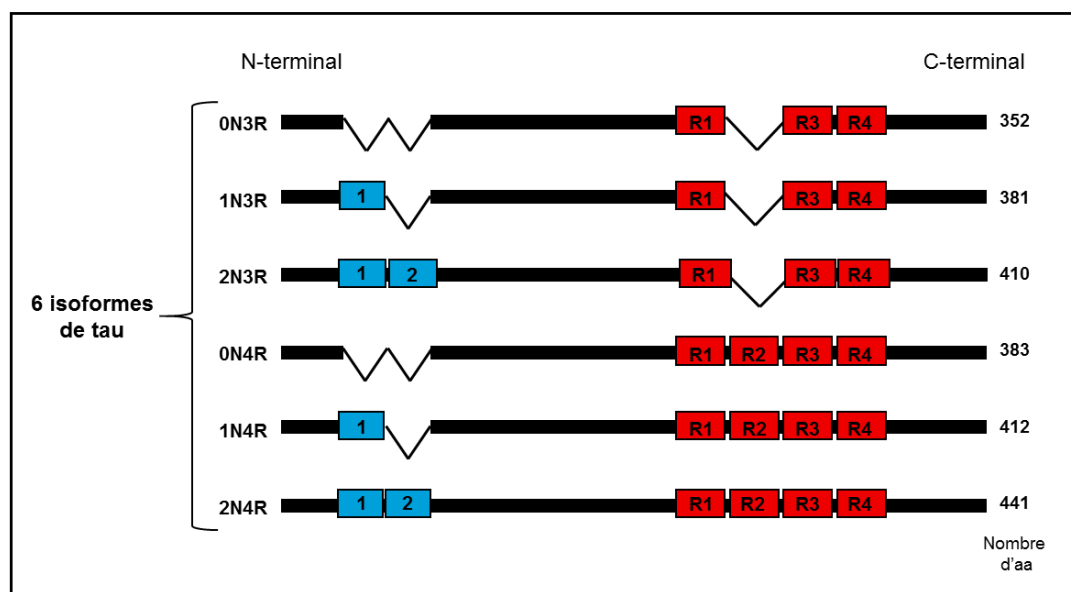


Figure 30. Structure des six isoformes de tau présentes dans le cerveau humain adulte. L'inclusion ou non des exons 2 et 3 donne naissance aux isoformes dites 0N, 1N et 2N. L'inclusion ou non de l'exon 10 génère 3 ou 4 séquences répétées (R1, R2, R3 et R4), à l'origine des isoformes de tau dites 3R ou 4R (adapté de Rosenberg et al., 2008).

Ces six isoformes se différencient donc dans leur partie N-terminale par l'absence ou la présence d'une ou de deux séquences de 29 aa, appelées « N » (résultant de l'épissage alternatif des exons 2 et 3), et dans leur partie C-terminale par la présence de trois ou quatre séquences répétées de 31 ou 32 aa chacune, appelées « R » (résultant de l'épissage alternatif de l'exon 10) (Figure 30). L'isoforme la plus courte contient 352 aa (45 kDa) et la plus longue

441 aa (65 kDa) (Andreadis, 2005). Les six isoformes sont exprimées à l'âge adulte chez l'homme, mais, au stade fœtal, seule l'isoforme tau0N3R est exprimée (Goedert et al., 1989). Les isoformes les plus abondantes dans le cerveau adulte sont tau1N4R et tau1N3R, avec un ratio des isoformes 4R sur les isoformes 3R proche de 1 (Goedert et Jakes, 1990).

La protéine tau peut être décomposée en trois régions principales. Celles-ci possèdent des propriétés chimiques et physiologiques différentes. De plus, en raison des charges de ses différentes régions, la protéine peut être considérée comme un dipôle (Figure 31). La partie N-terminale de tau est acide. L'inclusion des exons 2 et 3 renforce ce caractère acide par l'ajout d'acides glutamiques et aspartiques. Le rôle de ces inclusions est peu connu. Cette région présente un point isoélectrique (p.i.) de 4. Elle constitue le domaine de projection de la protéine qui s'oriente vers l'extérieur du microtubule et ne s'associe pas aux microtubules (Hirokawa et al., 1988). Ce domaine pourrait déterminer l'espacement entre les microtubules adjacents d'un faisceau (Chen et al., 1992). La région centrale contient un domaine riche en proline (PRD, pour Proline-Rich Domain), divisée en deux sous-domaines : P1 et P2. Le p.i. de cette région est de 10. Elle contient de nombreux sites de phosphorylation reconnus par différentes kinases. Le domaine P2 semble être important pour l'ancrage de la protéine aux microtubules (Trinczek et al., 1995). La région C-terminale de la protéine est basique, avec un p.i. autour de 10. Elle comprend le domaine de liaison aux microtubules (MTBD, pour MT Binding Domain), qui est constitué des 3 ou 4 motifs répétés (« R »). Ces répétitions sont en fait constituées de 18 aa très fortement conservés d'un motif à l'autre (Lee et al., 1988 ; Himmler et al 1989), et de séquences « inter-repeat » de 13 ou 14 aa faiblement conservées situées à la fin de chaque répétition. A la fin du MTBD, on trouve également une région appelée « pseudo-repeat » ou « R' », présentant une homologie avec les autres domaines R. R' serait impliquée, comme P2, dans l'ancrage de tau aux microtubules. Pour finir, tau est constituée d'une queue C-terminale, plutôt acide (p.i.=5,8). Les séquences répétées R1, R2, R3 et R4 de la protéine tau présentent une forte homologie avec celles d'autres MAPs, comme MAP2 et MAP4 (Dehmelt et Halpain, 2005). Elles ont un rôle primordial dans l'activité de tau sur les microtubules.

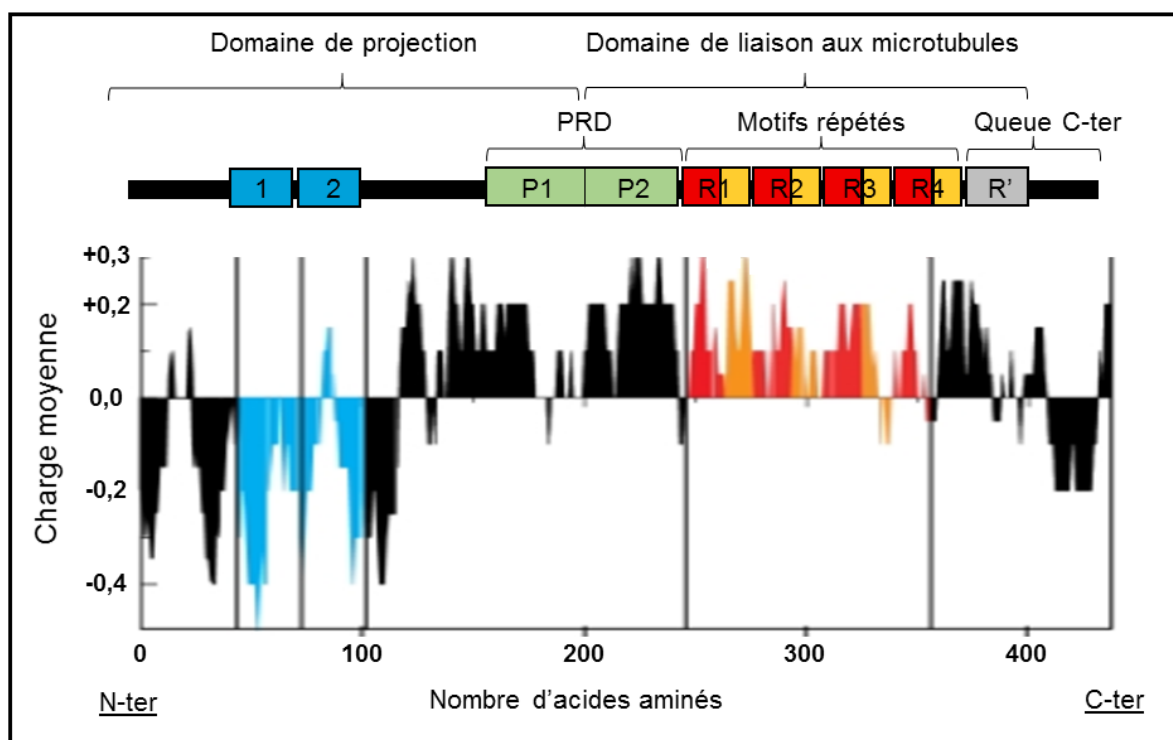


Figure 31. Structure primaire de l'isoforme tau2N4R. Le domaine de projection de tau se compose d'une région N-terminale acide et de la partie P1 du domaine riche en proline (PRD). Le domaine de liaison aux microtubules est basique et est constitué de la partie P2 du PRD, des motifs répétés, et de R'. Les inter-repeats sont représentées en orange. Adapté de Rosenberg et al., 2008.

2. Structure de tau en solution

Du fait de sa forte composition en acides aminés polaires ou chargés, tau présente un caractère très hydrophile qui en fait une protéine très soluble. De plus, elle est thermostable et résiste aux acides (Cleveland et al., 1977). Des travaux de résonance magnétique nucléaire (RMN), de diffusion des rayons X aux petits angles (SAXS) et de dichroïsme circulaire révèlent que tau adopte une structure non repliée en solution, alors que la plupart des protéines sont compactes dans ces conditions (Cleveland et al., 1977 ; Schweers et al., 1994 ; Mylonas et al., 2008 ; Mukrasch et al., 2009). Pour comparaison, le rayon de giration de tau est de l'ordre de 5-6 nm alors qu'il n'excède pas 2 nm pour une protéine globulaire (Mylonas et al., 2008). On peut penser que cette caractéristique pourrait lui permettre d'interagir avec plusieurs partenaires protéiques en même temps. Par ailleurs, cette configuration étendue explique que tau soit anormalement retardée quand elle migre sur des gels SDS-PAGE (Lee et al., 1988 ; Lichtenberg et al., 1988). Tau est donc une protéine à conformation variable. Cependant, des études en RMN ont révélé qu'elle comporterait quelques structures

secondaires transitoires (Eliezer et al., 2005 ; Mukrasch et al., 2005). En effet, tau possède deux hexapeptides, au début des répétitions R2 et R3, capables de s'arranger en feuillet β : $^{275}\text{VQIINK}^{280}$ et $^{306}\text{VQIVYK}^{312}$ (Mukrasch et al., 2005). Ces motifs sont responsables de l'agrégation de tau sous forme de filaments (ou « PHFs », pour Paired Helical Filaments) dans la maladie d'Alzheimer, et sont appelés PHF6* et PHF6 respectivement (von Bergen et al., 2000). Des études par transfert d'énergie de fluorescence par résonance (FRET, pour Fluorescence Resonance Energy Transfer) ont également été menées pour examiner la proximité des différents domaines de tau et leur flexibilité (Jeganathan et al., 2006). Les résultats indiquent que la queue C-ter de tau serait proche du centre du MTBD, alors que le domaine N-ter en serait éloigné, mais que les domaines N-ter et C-ter seraient à proximité l'un de l'autre. Ils en déduisent une compaction de tau en forme de « trombone », résultant de la juxtaposition des domaines N-ter et C-ter (Figure 32). Une étude plus récente par RMN confirme ces résultats et montre l'existence de contacts transitoires entre les extrémités N- et C-terminales de tau et le MTBD (Mukrasch et al., 2009).

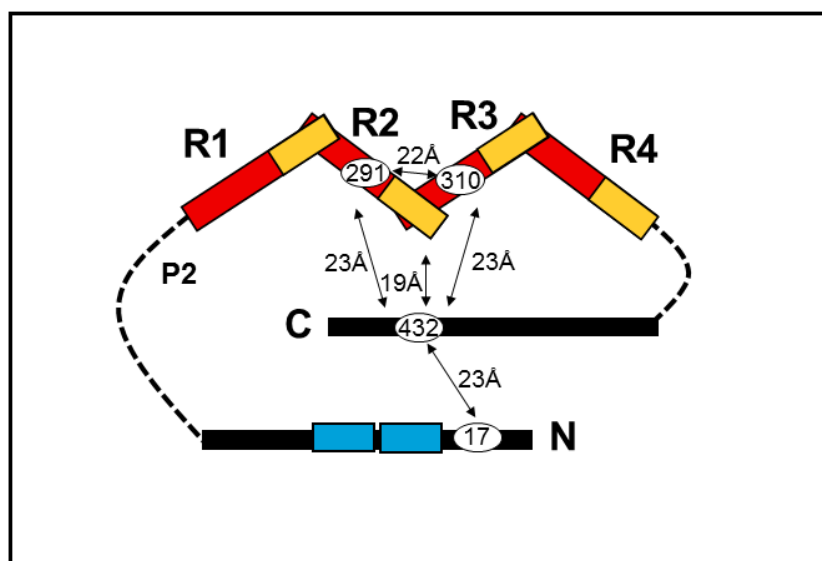


Figure 32. Modèle de l'organisation spatiale de tau en solution. Tau se replierait en formant une structure en trombone, dans laquelle le domaine N-terminal recouvrirait le domaine C-terminal, ce dernier se trouvant à proximité des répétitions du domaine de liaison aux microtubules. Les distances approximatives entre les résidus testés par FRET sont indiquées (adapté de Jeganathan et al., 2006).

3. Sites d'interaction et structure de tau sur les microtubules

Les motifs répétés et les régions flanquantes constituant le MTBD ont largement été étudiés pour leur rôle dans la liaison de tau aux microtubules. Tau interagit avec les microtubules via ses 3 ou 4 motifs répétés par l'intermédiaire des 18 aa conservés. De part et

d'autre de ces motifs répétés, la région riche en proline P2 et le domaine R' ont été également identifiés comme des éléments clés de la liaison de tau aux microtubules (Trinczek et al., 1995 ; Goode et al., 1997 ; Mukrasch et al., 2005 ; Mukrasch et al., 2007 ; Mukrasch et al., 2009). Le modèle dit « en mâchoire » (« jaws » model) propose que les domaines répétés permettraient l'activité catalytique de tau sur le microtubule et que les régions flanquantes P2 et R' constitueraient les régions d'ancrage initial de la MAP (Gustke et al., 1994 ; Goode et al., 1997 ; Mukrasch et al., 2007 ; Sillen et al., 2007) mais ne stabiliseraient pas les polymères (Preuss et al., 1995). Il existe également un autre modèle, le « core model » (Goode et Feinstein, 1994 ; Goode et al., 2000), dans lequel tau se lierait directement au microtubule via les répétitions (principalement les deux premières) et les zones flanquantes joueraient uniquement un rôle régulateur « isoforme-dépendant ». Des études récentes en RMN sur la protéine tau entière ou des fragments en présence de microtubules ont permis d'identifier les acides aminés (« hot spots ») directement impliqués dans la liaison de tau aux microtubules : 168-185 (dans le P1), 224-253 (dans le P2), 245-253 (début du R1), 269-284 (début du R2), 300-313 (début du R3), 375-398 (R') (Kadavath et al., 2015a et b ; Mukrasch et al., 2009) (Figure 33A). Ces régions de forte affinité pour les microtubules sont séparées par des séquences peu structurées qui ont une affinité moindre pour les microtubules et peuvent expliquer la conformation flexible de tau (Butner et Kirschner, 1991 ; Trinczek et al., 1995 ; Mukrasch et al., 2005). De façon importante, Kadavath et al. (2015b) ont révélé que les deux hexapeptides localisés au début de R2 et de R3 et impliqués dans la formation de feuillettes β s'ancreraient très fortement dans la paroi des microtubules et serviraient de pivots au reste de la protéine (Mukrasch et al., 2005 ; Mukrasch et al., 2009). Chaque hexapeptide, entouré par quelques acides aminés, adopterait une configuration en épingle à cheveux qui agirait comme un « crochet » se fixant dans une poche entre les dimères de tubuline et permettant ainsi d'ancrer tau aux microtubules (Kadavath et al., 2015b) (Figure 33B). Par ailleurs, les résidus concernés par cette conformation en épingle à cheveux sont importants pour l'agrégation pathologique de tau (Mukrasch et al., 2005). Ces résultats montrent donc que lorsque tau est liée aux microtubules, les résidus nécessaires à l'agrégation pathologique de tau sont stabilisés dans une conformation qui doit être déstabilisée pour pouvoir initier la formation de feuillettes β .

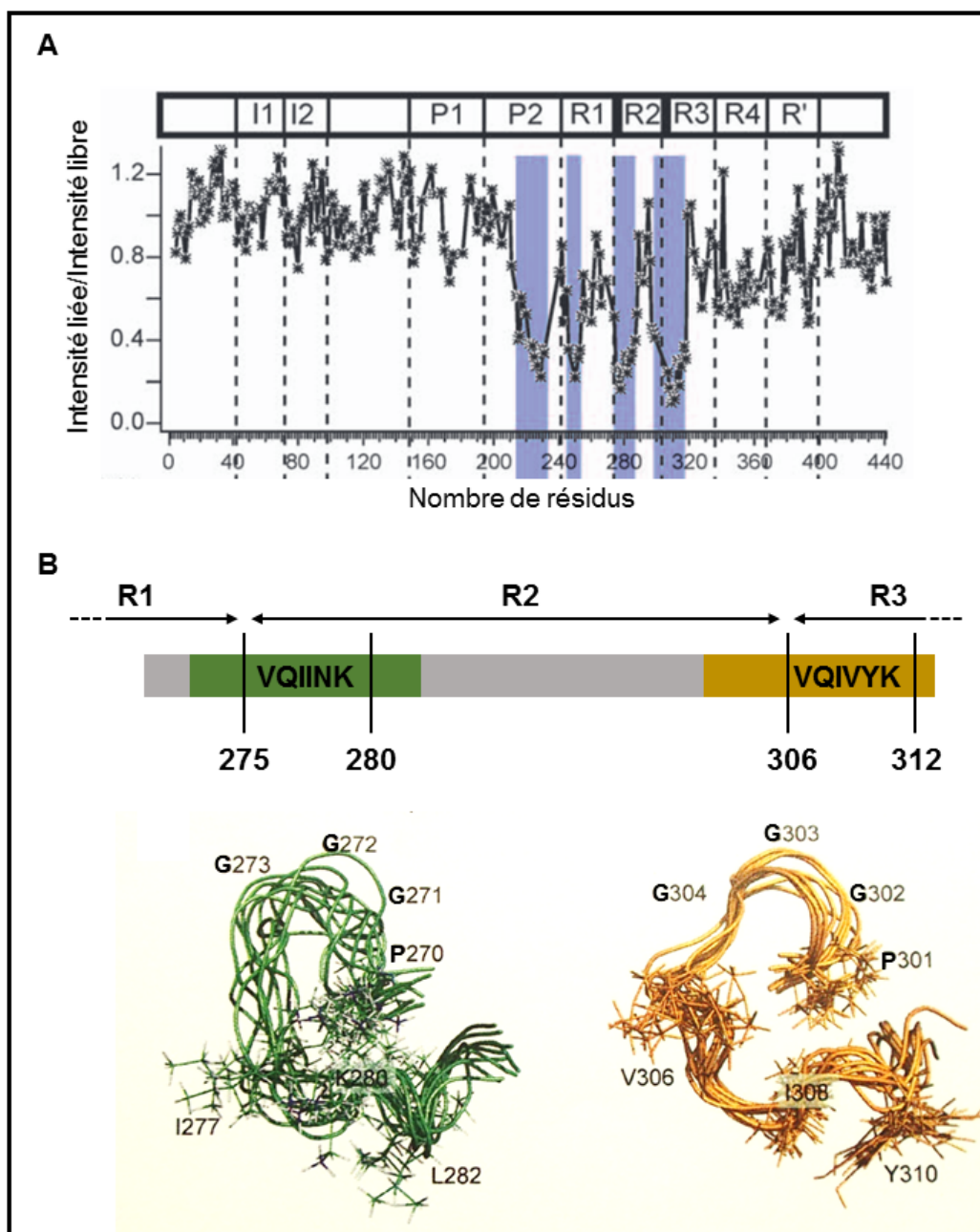


Figure 33. Interaction de tau avec les microtubules. (A) Rapports de signal d'intensité de RMN entre les signaux observés lorsque tau est incubé avec les microtubules par rapport à son état libre. Les régions interagissant fortement avec les microtubules (« hot spots ») sont représentées en bleu (d'après Mukrasch et al., 2009). (B) Structures formées au sein des motifs répétés lorsque tau est liée aux microtubules. Conformation des résidus 269-284 (à gauche) et 300-311 (à droite). Ils forment une structure en épingle à cheveux qui peut s'ancrer entre les hétérodimères de tubuline. Les séquences flexibles PGGG au début de chaque épingle permettent leur conformation en boucle. Les tracés représentent les dix conformères d'énergie les plus faibles (d'après Kadavath et al., 2015).

La conformation globale de tau et les sites précis de fixation de tau sur le microtubule restent difficiles à analyser car tau demeure très flexible lorsqu'elle est liée aux microtubules.

Des études initiales en cryo-EM de complexes entre des microtubules stabilisés au taxol et la protéine tau ont montré que tau se liait le long et entre les protofilaments (Al-Bassam et al., 2002 ; Santarella et al., 2004). Cependant, une autre étude structurale par cryo-EM de liaison de tau sur des microtubules non stabilisés au taxol mais co-polymérisés en présence de tau propose l'existence de deux sites de fixation de tau sur les microtubules : un site sur la surface interne du microtubule (identique au site de fixation du taxol), et un site sur sa surface externe (Kar et al., 2003). Les motifs répétés se fixeraient latéralement le long des hélices latérales formés par les monomères de tubulines et stabiliseraient ainsi les interactions latérales entre protofilaments (Figure 34E et F). D'autres études ont également mis en évidence l'existence de deux sites d'interaction de tau avec les microtubules, présentant des affinités différentes (Makrides et al., 2004 ; Tsvetkov et al., 2012). En particulier, Makrides et al. en 2004 suggèrent l'existence d'un site irréversible à l'intérieur du microtubule et un site réversible à l'extérieur. Plus récemment, des études par RMN et FCS (Corrélation de fluorescence par spectroscopie) sur des complexes tubuline/tau ont montré que tau favorise à la fois les interactions longitudinales et latérales entre les dimères de tubuline (Gigant et al., 2014 ; Li et al., 2015). Des expériences par pontage et spectrométrie de masse sur des complexes tau/tubuline et tau/microtubules ont également identifié un site majeur de liaison de tau sur la sous-unité α de la tubuline à l'interface des hétérodimères (Kadavath et al., 2015a). Le domaine de projection de tau n'aurait aucune affinité pour les microtubules. Le rôle des domaines alternatifs codés par les exons 2 et 3 ne sont pas bien connus. Ils pourraient impacter le diamètre axonal, réguler l'interaction de tau avec la membrane plasmique, inhiber la nucléation des microtubules ou limiter l'accès des kinésines aux microtubules (Chen et al., 1992 ; Brandt et Lee, 1993 ; Brandt et al., 1995 ; Dixit et al., 2008).

En conclusion, la connaissance des mécanismes de liaison de tau aux microtubules a beaucoup avancé ces dernières années, notamment grâce aux études récentes par RMN, mais il reste des questions ouvertes : quelle est la conformation globale de tau sur les microtubules ? Quels sont les sites précis de fixation de tau aux microtubules ?

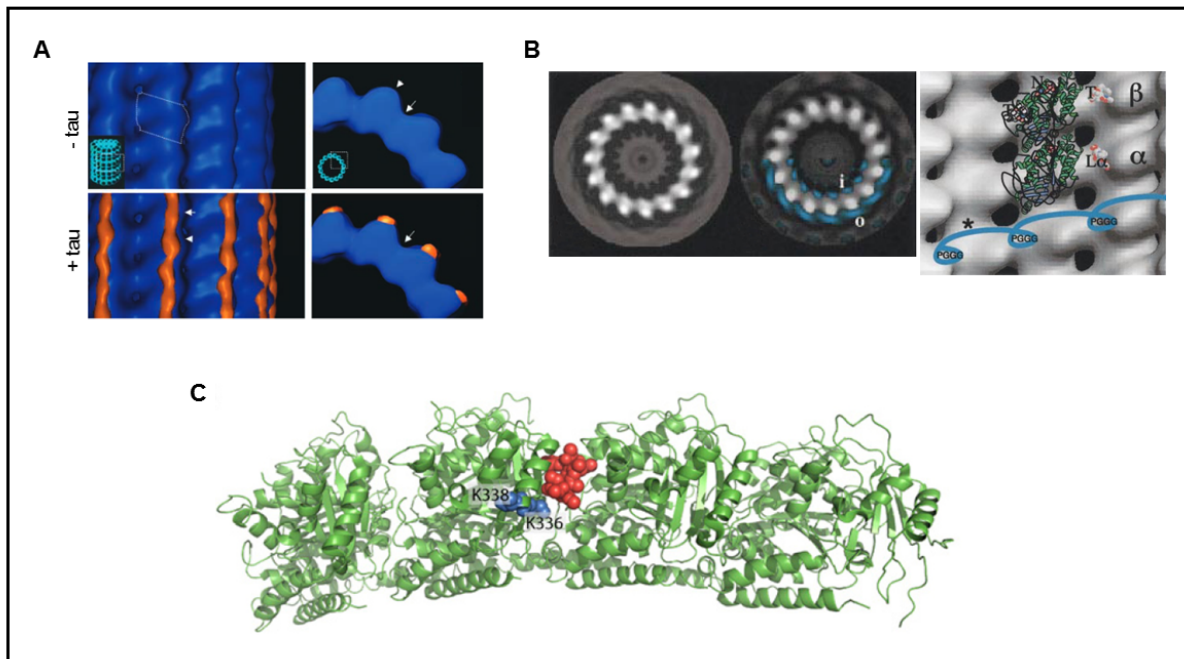


Figure 34. Modèles de liaison de tau aux microtubules. (A) Reconstruction 3D de microtubules stabilisés au taxol et décorés ou non avec tau (en orange) obtenues par cryo-EM. La tête de flèche montre la crête d'un protofilament et la flèche la vallée entre deux protofilaments. Le microtubule est observé de profil (à gauche) ou de son extrémité (à droite) (d'après Al-Bassam et al., 2002). (B) Reconstruction 3D obtenues par cryo-EM de microtubules co-polymérisés en absence ou en présence de tau. Le microtubule est observé de son extrémité (à gauche). A droite, la structure 3D du microtubule a été superposée à la structure atomique d'un dimère de tubuline. L'interaction possible de tau avec le microtubule est schématisée en bleu. Les séquences flexibles PGGG présentes au sein des répétitions représenteraient le site majeur d'interaction avec le microtubule. T, Taxol, N, nucléotide, L α , boucle sur la tubuline α similaire au site occupé par le taxol sur la sous-unité β . L'astérisque montre la région « inter-repeat » (d'après Kar et al., 2003). (C) Site de fixation de tau sur la tubuline (Kadavath et al., 2015a). Structure atomique de deux hétérodimères de tubuline complexés à la vinblastine (en rouge) (Gigant et al., 2005). Les deux lysines 336 et 338 localisées dans le domaine C-terminal de la sous-unité α de la tubuline ont été identifiées comme interagissant avec tau par des expériences de pontage et de spectrométrie de masse (d'après Kavath et al., 2015a).

4. Effet de tau sur l'assemblage et la stabilisation des microtubules

Tau joue un rôle majeur dans la régulation de la nucléation et de la dynamique des microtubules au sein des neurones (pour revue, Cassimeris et Spittle, 2001). *In vitro*, elle est capable, même en très faibles quantités, de stimuler la nucléation et l'assemblage de microtubules à des concentrations en tubuline inférieure à la concentration critique (Cleveland et al., 1977 ; Goedert et Jakes, 1990 ; Brandt et Lee, 1994 ; Trinckzek et al., 1995). Tau agit sur tous les paramètres de l'instabilité dynamique : elle augmente la vitesse de polymérisation

des microtubules, diminue leur vitesse de dépolymérisation, diminue la fréquence de catastrophes et augmente la fréquence de sauvetages (Witman et al., 1976 ; Brandt et Lee, 1993 ; Panda et al., 1995). Des études dans des modèles cellulaires ont permis de confirmer le rôle de tau dans la dynamique des microtubules (Drubin et Kirschner, 1986 ; Bunker et al., 2004). En particulier, une micro-injection de tau purifiée dans des cultures de fibroblastes permet d'augmenter la densité microtubulaire et de protéger les microtubules d'une dépolymérisation induite par des agents déstabilisants (Drubin et Kirschner, 1986).

Les six isoformes de tau sont toutes capables de stimuler l'assemblage et de stabiliser les microtubules avec cependant des différences d'activité entre les isoformes composées de 4 répétitions (4R) et celles composées de 3 répétitions (3R) (Goedert et Jakes, 1990 ; Butner et Kirschner, 1991 ; Panda et al., 2003). De plus, l'insertion des répétitions N-terminales ne semble pas avoir d'effet sur les fonctions de tau (Goedert et Jakes, 1990 ; Trinczek et al., 1995 ; Levy et al., 2005). Les domaines identifiés comme nécessaires à la stimulation de l'assemblage de la tubuline sont les 4 répétitions R1 à R4 et les régions flanquantes P2 et R' (Brandt et Lee, 1994 ; Trinczek et al., 1995), bien que les mécanismes moléculaires à l'origine de cette polymérisation restent peu compris. Comme mentionné précédemment, deux modèles (« jaws » et « core ») ont été proposés pour expliquer l'activité promotrice de tau sur la polymérisation de la tubuline, avec fixation de tau à la tubuline par les régions flanquantes du MTBD et une activité catalytique portée par la totalité ou un groupe de répétitions (Gustke et al., 1994 ; Goode et al., 1997 ; Mukrasch et al., 2007 ; Sillen et al., 2007 ; Goode et al., 2000). Des études récentes montrent que tau forme un complexe avec plusieurs dimères de tubuline (Devred et al., 2004 ; Gigant et al., 2014 ; Li et al., 2015), suggérant que tau stimule la nucléation et l'élongation des microtubules en favorisant les interactions latérales et/ou longitudinales entre les dimères de tubuline solubles ou entre les dimères de tubuline et la paroi du microtubule (Li et al., 2015). De plus, la fixation de tau le long et entre les protofilaments du microtubule, mise en évidence par les résultats de cryo-EM (Figure 35), suggère un mécanisme de stabilisation des microtubules par renforcement des interactions longitudinales et/ou latérales entre dimères de tubuline (Al-Bassam et al., 2002 ; Santarella et al., 2004). Cela permettrait de maintenir la tubuline-GDP dans une conformation droite et expliquerait pourquoi les microtubules sont moins sujets aux catastrophes aux endroits où tau se fixe (Ichihara et al., 2001).

5. Organisation des microtubules en faisceaux par tau

La surexpression de tau dans différents types cellulaires conduit à la formation de faisceaux microtubulaires (Kanai et al., 1989 ; Preuss et al., 1997) (Figure 40A), suggérant que tau est capable de former des ponts physiologiques entre les microtubules. La possibilité de former des faisceaux de microtubules constitue une autre fonction importante de la protéine tau. Les faisceaux sont des structures fondamentales pour la formation et le maintien des axones ainsi que pour le transport de cargos à l'intérieur de celui-ci. Dans les faisceaux des axones, les microtubules sont espacés de façon uniforme avec une distance inter-microtubules de 20-30 nm alors que cette distance est de 60-70 nm dans les dendrites (Chapin et al., 1991 ; Chen et al., 1992 ; Kanai et al., 1992). Des études initiales par microscopie électronique et cryo-décapage (Hirokawa et al., 1988 ; Chen et al., 1992) ont permis de visualiser des ponts entre microtubules dans des cellules SF9 exprimant tau ou MAP2, et également entre des microtubules co-polymérisés *in vitro* avec tau ou MAP2. Ces ponts mesurent environ 20 nm avec tau et 60 nm avec MAP2, suggérant que le domaine de projection de ces MAPs neuronales déterminerait la distance inter-microtubules dans les faisceaux d'axones et dendrites respectivement (Black, 1987 ; Chen et al., 1992 ; Hirokawa et al., 1988). Cependant, la distance inter-microtubules dans les faisceaux induits par tau est controversée, puisqu'une étude récente indique un espacement d'environ 10 nm entre microtubules co-polymérisés *in vitro* avec tau, et d'environ 15 nm dans des cellules SF9 surexprimant tau (Shahpasand et al., 2012 ; Knops et al., 1991). Il a également été proposé que, dans les neurones, tau, en association avec d'autres MAPs, pourraient former une couche « en brosse » sur la surface externe des microtubules, celle-ci étant formée par les différents domaines de projection des MAPs (Mukhopadhyay et Hoh, 2001 ; Mukhopadhyay et al., 2004). La présence de cette couche serait à l'origine d'un encombrement stérique qui suffirait à induire l'organisation du réseau de microtubules. Marx et al. en 2000 proposent un modèle, grâce à des expériences de diffusion aux rayons X, où la structure de tau, flexible et compressible, jouerait un rôle d'« écarteur » de microtubules et empêcherait les microtubules de se rapprocher. Il n'y aurait donc pas de pontage entre les microtubules. A contrario, d'autres hypothèses formulent que tau pourraient former un pont entre les microtubules via des interactions tau-tau ou via une liaison d'une seule molécule de tau sur deux microtubules en même temps (Aamodt et Culotti, 1986 ; Hirokawa et al., 1988 ; Chen et al., 1992). Une autre hypothèse est que les microtubules voisins, chargés négativement, se repousseraient et

que la fixation de tau sur leur surface, neutralisant ces charges négatives par l'apport de charges positives, permettrait un rapprochement des microtubules (Scott et al., 1992). L'étude la plus récente sur le mécanisme de formation des faisceaux de microtubules par tau propose que la protéine forme un dimère entre les microtubules, via son domaine de projection (Rosenberg et al., 2008) (Figure 35C), comme cela a été proposé par exemple pour la protéine MAP65 (Gaillard et al., 2008 ; Tulin et al., 2012). Les auteurs ont utilisés des surfaces de mica chargées négativement pour mimer les microtubules et ont mesuré la distance séparant deux surfaces l'une de l'autre lorsqu'elles sont recouverte de protéines tau (Rosenberg et al., 2008). Ils ont conclu que cette distance était incompatible avec une protéine restant monomérique mais correspondrait à la distance formée par deux protéines tau s'associant tête-bêche. Ce dimère serait formé par des liaisons électrostatiques entre les domaines de projection de chaque tau (du N-terminal jusqu'à la fin du P1), composés d'une partie acide et d'une partie basique. En accord avec ce modèle, Kanai et al. (1992) proposent que les domaines N-ter et le PRD de tau seraient nécessaires à la formation de faisceaux (Kanai et al., 1992). Cependant, d'autres études montrent que le domaine de projection, les domaines riches en prolines et/ou la queue C-terminale inhibent ou ne sont pas nécessaires à ce processus (Brandt et Lee, 1993 ; Scott et al., 1992 ; Fauquant et al., 2011). Ainsi, à ce jour, il n'existe pas de mécanisme précis permettant d'expliquer la formation des faisceaux de microtubules par tau. L'une des limites est l'absence d'observation directe de ce processus, que ce soit en système cellulaire ou purifié. De plus, lorsqu'elle est purifiée, la protéine tau perd son activité si elle est couplée à une protéine fluorescente, et sa structure très labile fait que sa conformation globale est difficilement observable sur les microtubules, notamment par cryo-EM.

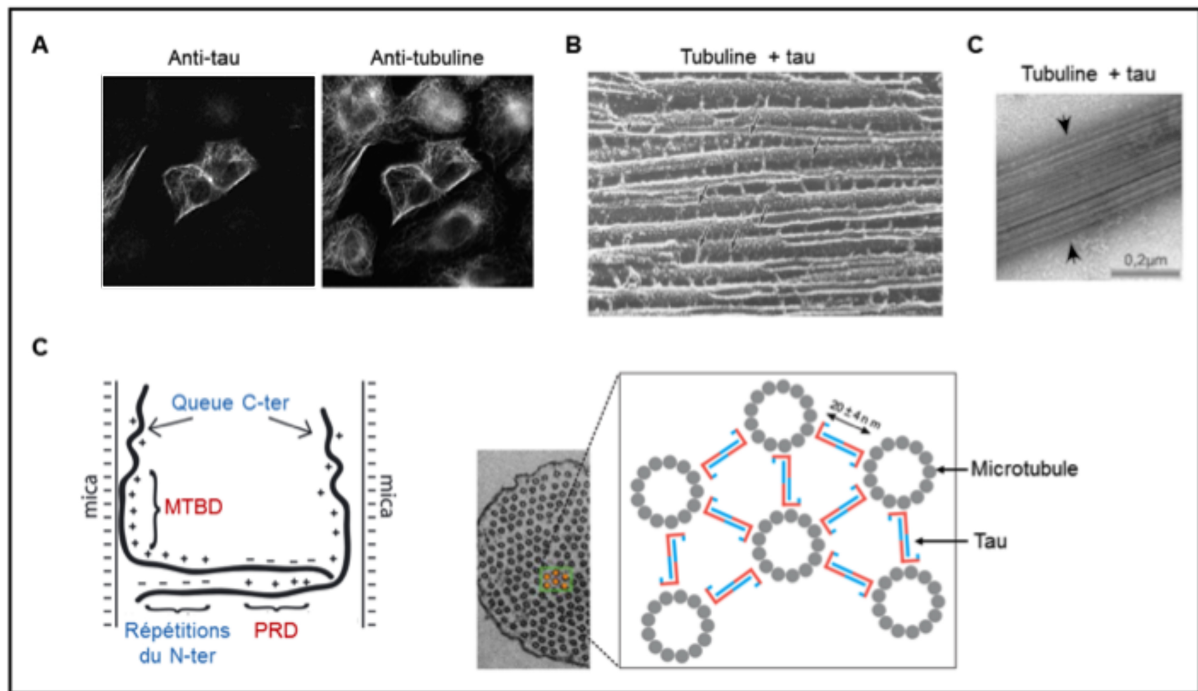


Figure 35. Mécanisme de formation des faisceaux de microtubules par tau. (A) Apparition de faisceaux de microtubules dans des cellules CHO micro-injectées avec tau (tiré de Preuss et al., 1997). (B) Image après par microscopie électronique après cryo-décapage de faisceaux de microtubules formés *in vitro* en présence de tau. Les flèches indiquent les ponts de tau entre les microtubules (tiré de Hirokawa et al., 1988). (C) Images de microscopie électronique montrant des faisceaux de microtubules résultant de l'assemblage de tubuline en présence de tau (tiré de Fauquant et al., 2011). (D) A gauche : modèle dans lequel tau forme un dimère antiparallèle maintenu par des liaisons électrostatiques entre deux surfaces de mica. A droite : faisceaux de microtubules dans des cellules Sf9 transfectées avec tau et modèle d'organisation de tau entre les microtubules en coupe transversale. Les régions rouges correspondent aux domaines basiques de tau et les régions bleues aux domaines acides (tiré de Rosenberg et al., 2008).

6. Interaction de tau avec l'actine

L'interaction de tau avec le cytosquelette d'actine est longtemps restée controversée. Elle a tout d'abord été suggérée par une étude de 1982, dans laquelle les auteurs ont pu observer la formation d'un gel d'actine de forte viscosité en présence de différentes MAPs, dont tau (Griffith et Pollard, 1982). Par la suite, plusieurs études ont reporté l'association de l'actine avec des sous-régions de tau contenant les sites de liaison aux microtubules (Correas et al., 1990 ; Moraga et al., 1993 ; Farias et al., 2002) et, plus récemment, avec la protéine tau entière (Fulga et al., 2007 ; He et al., 2009) ou avec des sous-régions de tau contenant les sites de liaison aux microtubules (Correas et al., 1990 ; Moraga et al., 1993 ; Farias et al., 2002). Cependant, cette interaction directe a aussi été controversée par une étude en système purifié, montrant que tau, contrairement à MAP2C, n'est pas capable d'interagir avec les filaments

d'actine (Roger et al., 2004). *In vivo*, tau co-localise avec l'actine dans des cellules PC12 en différenciation (Yu et Rasenick, 2006) et dans le compartiment post-synaptique de neurones matures (Franssen et al., 2014). Tau a également été observée le long de microtubules dynamiques au niveau des régions riches en actine de cônes de croissance (Black et al., 1996 ; Li et al., 2014). De plus, la neurotoxicité de tau dans un modèle animal de la maladie d'Alzheimer corrèle avec des altérations de l'organisation du réseau d'actine (Fulga et al., 2007). Cette interaction de tau avec l'actine, couplée à celle de tau avec les microtubules, pourrait permettre une coordination entre les microtubules et les filaments d'actine dans les neurones, assurant leur activité synergique notamment au niveau du cône de croissance des axones en développement ou dans les épines dendritiques de neurones matures.

7. Autres partenaires et autres fonctions de tau

La protéine tau n'est pas retrouvée uniquement dans le cytoplasme mais aussi dans le noyau des cellules neuronales (Loomis et al., 1990) et non neuronales (Sjöberg et al., 2006). En effet, tau serait présente au sein du nucléole, sous-compartiment du noyau où se déroule la transcription des ARN ribosomiques, et plus précisément au niveau de l'hétérochromatine constitutive (Sjöberg et al., 2006). Ces observations suggèrent que tau jouerait un rôle dans l'organisation nucléolaire et dans l'hétérochromatinisation des gènes codants pour les ARN ribosomiques. Par ailleurs, des études *in vitro* ont démontré que tau était capable de se lier directement à l'ADN (Qu et al., 2004), et que cette interaction était réversible en cas de présence d'histones (Hua et al., 2003). Les motifs répétés du domaine de liaison aux microtubules et le PRD de tau seraient impliqués dans cette interaction (Wei et al., 2008 ; Qi et al., 2015). De plus, des travaux récents dans des cultures primaires de neurones indiquent que tau est capable, en condition de stress thermique ou oxydatif, de se relocaliser dans le noyau et d'établir une liaison avec l'ADN. Cette interaction permettrait à tau de protéger l'ADN des lésions induites par le stress (Sultan et al., 2011). Ces hypothèses ont été vérifiées dans des souris KO-tau pour lesquelles l'induction d'un choc thermique entraîne des dommages plus importants de leur ADN comparé à celui de souris sauvages (Violet et al., 2014).

Par ailleurs, le domaine riche en prolines de tau est capable d'interagir, via les motifs PXXP, avec certaines protéines possédant un domaine SH3 (Src Homology 3). Les kinases de la famille Src font partie de ces protéines et certaines peuvent interagir avec tau au niveau de

la membrane plasmique (Lee et al., 1998). Parmi elles, tau peut s'associer avec les kinases c-Src et Fyn (Lee et al., 1998 ; Reynolds et al., 2008). Fyn et c-Src sont impliquées dans la phosphorylation du récepteur neuronal NMDA, récepteur post-synaptique essentiel à la signalisation moléculaire pour la mémoire et la plasticité synaptique (Blum et Konnerth, 2005). Tau servirait de médiateur entre Fyn et le récepteur NMDA puisqu'en l'absence de tau, Fyn ne se déplace plus vers les compartiments post-synaptiques des dendrites et la fonction synaptique est altérée (Ittner et al., 2010 ; Mondragon-Rodriguez et al., 2012). Tau est capable d'interagir avec d'autres protéines possédant un domaine SH3 tels que PLC γ (Phospholipase C γ) et PI3K (phosphoinositide 3-kinase), confirmant son rôle potentiel dans les voies de transduction du signal (Reynolds et al., 2008).

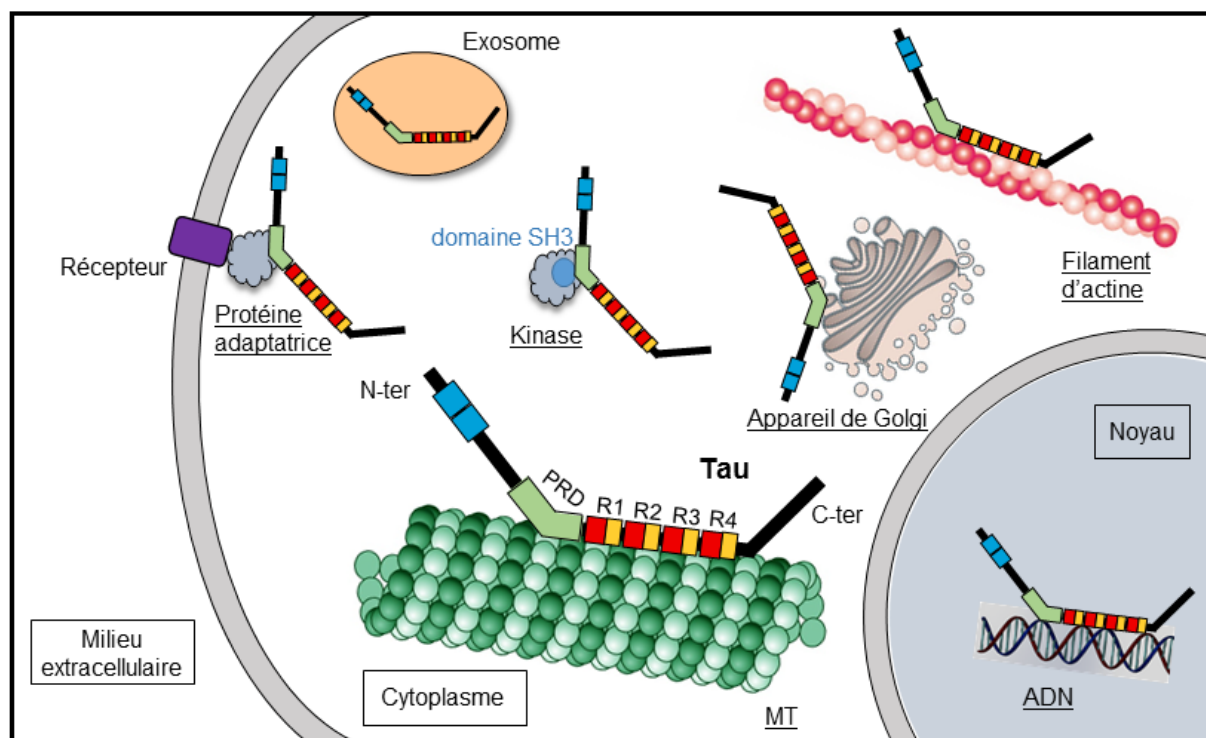


Figure 36. Localisations et partenaires de tau dans la cellule. Tau interagit avec les microtubules et probablement avec l'actine via son MTBD, avec des kinases ou des protéines adaptatrices possédant un domaine SH3 via son PRD, et avec l'ADN.

Tau peut aussi agir comme un inhibiteur direct d'activités enzymatiques. Par exemple, elle peut s'associer et inhiber l'histone deacétylase-6 (Perez et al., 2009), enzyme qui deacétyle la tubuline et régule donc la stabilité des microtubules. Tau pourrait donc affecter la dynamique des microtubules par un mécanisme indépendant de sa liaison directe à ces polymères.

Des études récentes montrent que tau peut être sécrétée dans le milieu extracellulaire lorsque les neurones sont activés, permettant un transfert de tau de neurone à neurone (Pooler et al., 2013 ; Dujardin et al., 2014). On ne connaît pas encore le rôle de cette localisation de tau dans les vésicules sécrétrices. Tau a également été retrouvée dans des fractions membranaires enrichies en appareil de Golgi provenant de cerveaux de rats, suggérant que tau pourrait interagir avec les membranes golgiennes et établirait un lien entre les microtubules et l'appareil de Golgi. Cette hypothèse a été confirmée *in vitro* à partir de constituants purifiés (Farah et al 2006). On ne sait cependant pas quels domaines de tau sont impliqués dans cette interaction. La figure 37 récapitule les interactions cellulaires de tau et le tableau de la figure 37 donne une liste non-exhaustive des différents partenaires de tau.

Partenaires directs de tau	Fonctions du partenaire	Références
ApoE3	Transporteur de lipides	Fleming et al., 1996 Strittmatter et al., 1994
Tubuline	Cytosquelette	Kar et al., 2003
C-Src	Kinase de la famille Src	Lee et al., 1998 Reynolds et al., 2008
Actine	Cytosquelette	He et al., 2009
Fgr	Kinase de la famille Src	Reynolds et al., 2008
Fyn	Kinase de la famille Src	Lee et al., 1998 Reynolds et al., 2008
Grb2	Protéine adaptatrice impliquée dans la signalisation des facteurs de croissance	Reynolds et al., 2008
Lck	Kinase de la famille Src	Lee et al., 1998
p85α	Sous-unité régulatrice de PI3K	Reynolds et al., 2008
Phosphatidylinositol	Lipide de signalisation	Surridge et Burns, 1994
Phosphatidylinositol bisphosphate	Lipide de signalisation	Flanagan et al., 1997
PLCγ	Clive les phospholipides pour produire des molécules de signalisation	Hwang et al., 1996 Jenkins et Johnson, 1998 Reynolds et al., 2008

Figure 37. Tau et certains de ses partenaires. Parmi eux : des éléments du cytosquelette, des molécules de signalisation, des enzymes et des lipides (d'après Morris et al., 2011).

Tau est donc une protéine à plusieurs facettes, capable de se localiser à plusieurs endroits de la cellule (sur les microtubules, sur l'actine, dans le noyau, au niveau de la membrane plasmique et de la membrane de l'appareil de Golgi) et d'avoir potentiellement de multiples fonctions. Les mécanismes qui régissent ces localisations subcellulaires différentielles ne sont pas élucidés. On peut penser qu'il existe un pool de protéine cytoplasmique qui peut être rapidement relocalisé suivant les besoins de la cellule et via des modifications post-traductionnelles de tau, ou bien qu'il existe plusieurs pools de tau spécifiques d'une localisation. L'existence de diverses fonctions de tau suggère que la perte ou l'altération d'une ou plusieurs de ses fonctions dans les neurones peuvent contribuer à des processus physiopathologiques.

8. Pathologies liées à la protéine tau

a) Généralités

Certaines maladies neurodégénératives, dont la maladie d'Alzheimer (MA), sont caractérisées par la présence d'agrégats intracellulaires de tau et sont regroupées sous le terme de tauopathies. Plus de vingt maladies neurologiques avec démence dues à cette pathologie de tau ont pu être recensées (Buée et al., 2000). Parmi elles, on trouve de nombreux syndromes parkinsoniens, certaines démences fronto-temporales (FTD), telles que la maladie de Pick et les FTDP-17 (Frontotemporal Demencia linked to chromosome 17) avec syndrome parkinsonien, et on trouve également le syndrome de Down et des dystrophies myotoniques comme la maladie de Steinert (Delacourte et Buée, 2000 ; Lee et al., 2001).

La tauopathie à l'origine de la majorité des démences actuelles est la maladie d'Alzheimer. Elle a été décrite au début du XX^{ème} siècle par Aloïs Alzheimer. C'est une maladie neurodégénérative liée à l'âge qui conduit progressivement et irréversiblement à la perte de la mémoire et des fonctions cognitives. Elle est caractérisée au niveau des neurones par des dégénérescences neurofibrillaires (DNF) et des dépôts amyloïdes extracellulaires résultant de l'accumulation du peptide β -amyloïde ($A\beta$) (Alzheimer, 1907). Pendant longtemps, on pensait que la cause principale de la mort neuronale était l'accumulation des plaques amyloïdes dans le cerveau des patients. Puis on a découvert un autre groupe de maladies, les tauopathies, comprenant les mêmes symptômes que la MA, mais caractérisées uniquement par l'agrégation de la protéine tau (Sergeant et al., 2008). Il a été montré, après

quantification spatio-temporelle des deux lésions de la maladie d'Alzheimer, qu'une pathologie de tau peut exister en l'absence de dépôts amyloïdes dans le cerveau de patients non encore déments. A l'opposé, tous les cas présentant des dépôts amyloïdes développent une pathologie liée à tau (Delacourte et al., 2002). Les interactions entre ces deux types de lésions qui s'installent progressivement dans la MA ne sont pas encore élucidées mais on sait qu'elles se potentialisent pour provoquer la mort neuronale. Chronologiquement, les DNFs apparaissent avant les plaques amyloïdes et seule l'évolution spatio-temporelle des DNFs est corrélée avec le déclin cognitif observé chez les patients (Arriagada et al., 1992 ; Delacourte et al., 1999 ; Braak et Del Tredici, 2004). L'agrégation de la protéine tau dans les neurones démarre dans la région de l'hippocampe et se poursuit ensuite dans les régions corticales associatives puis dans l'ensemble du cortex cérébral. Cette propagation conduit à la mort d'un grand nombre de neurones, entraînant l'apparition des signes cliniques de perte de mémoire et de démence (Braak et Braak, 1991).

Le rôle causal de tau dans les maladies neurodégénératives a directement été confirmé lors de la découverte de mutations dans le gène codant pour la protéine tau chez des patients atteints de démences fronto-temporales appelées FTDP17s (Hutton et al., 1998 ; Poorkaj et al., 1998 ; Spillantini et al., 1998). Aujourd'hui, plus d'une cinquantaine de mutations introniques et exoniques ont été décrites sur ce gène et sont systématiquement associées au développement de la pathologie. Ces mutations sont très souvent localisées dans les régions de tau codantes pour le domaine de liaison aux microtubules. Différentes conséquences fonctionnelles sont observées en fonction de la mutation considérée. Ainsi, certaines mutations vont conduire à des modifications de l'épissage alternatif des exons, entraînant un déséquilibre entre les quantités d'isoformes 4R et d'isoformes 3R; d'autres vont conduire à des pertes de fonctions physiologiques en inhibant l'interaction de tau avec les microtubules ; et d'autres vont entraîner un gain de fonction pathologique en favorisant notamment l'agrégation de tau (Dickson et al., 2011 ; Spillantini et Goedert, 2013). L'utilisation de certaines de ces mutations ponctuelles constitue un moyen très répandu pour modéliser la pathologie liée à tau.

Les agrégats de protéines tau retrouvés dans ces pathologies peuvent se présenter sous différentes formes dans les neurones : enchevêtrements neurofibrillaires (NFT, pour Neurofibrillary Tangles) dans la MA, corps de Pick dans la maladie de Pick, ou touffes gliales dans la PSP (Buée et al., 2000 ; Sergeant et al., 2005 ; Sergeant et al., 2008). Les

dégénérescences neurofibrillaires présentes dans les tauopathies sont visibles en microscope électronique sous forme de filaments appariés en hélice et torsadés, appelés PHF, pour Paired Helical Filaments (Kidd, 1963). Ces fibres font 10 à 15 nm d'épaisseur, avec un pas de 80 nm (Figure 38). Les PHFs sont des structures très insolubles constituées majoritairement de protéines tau aux propriétés physico-chimiques particulières : elles peuvent être mutées dans le cas des FTDP-17, sont moins solubles et plus acides (Sergeant et al., 1995) et possèdent un poids moléculaire plus élevé (Greenberg et Davies, 1990). Ces différences sont principalement liées à un niveau de phosphorylation plus élevé des protéines tau (Lee et al., 1991). D'autres modifications post-traductionnelles peuvent être altérées dans les protéines tau retrouvées (glycosylation, troncation), aspect qui sera détaillé dans le paragraphe suivant.

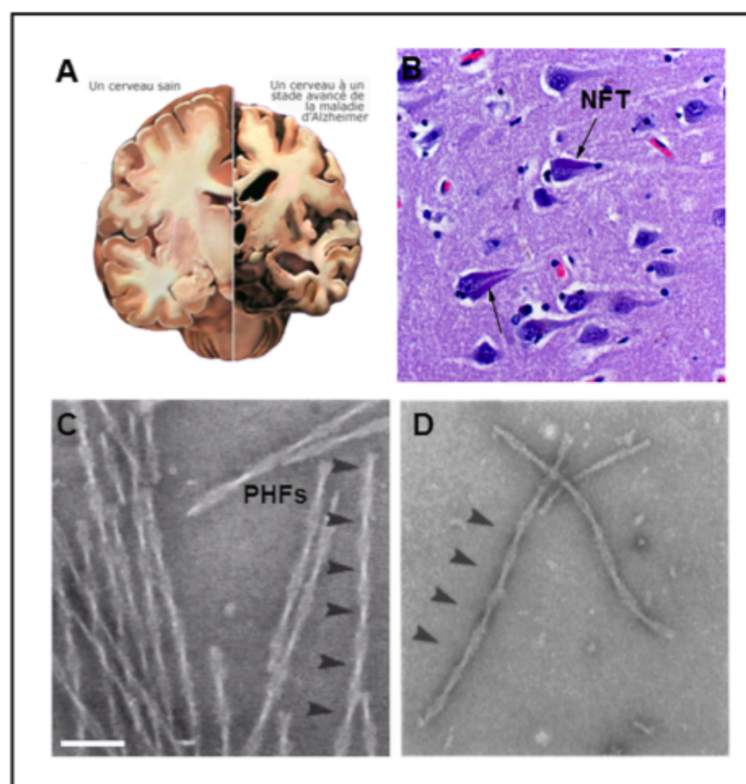


Figure 38. Marqueurs de la pathologie liée à tau. (A) Schéma d'un cerveau sain à gauche et d'un cerveau atteint de la maladie d'Alzheimer à droite présentant une forte perte de neurones (d'après Alzheimer's Association). (B) Enchevêtrements neurofibrillaires (NFTs) dans des neurones d'hippocampe d'une personne atteinte de la MA. (C) PHF imagés en microscopie électronique issus de NFT de cerveaux de patients atteints de la MA. (D) Les filaments peuvent être reconstitués *in vitro* à partir de fragments de tau purifiés. Les flèches indiquent la transition entre deux périodes. Barre d'échelle : 100 nm (tiré de Wille et al., 1992).

L'agrégation de la protéine tau a longtemps été considérée comme l'une des causes initiales et majeures du développement de la pathologie, en particulier en provoquant la déstabilisation et le désassemblage du cytosquelette microtubulaire. Cependant, ces dernières

années, cette vision a évolué et diverses observations suggèrent que les formes solubles des protéines tau modifiées seraient toxiques avant leur agrégation et induiraient une altération de l'activité neuronale (Feuillet et al., 2010 ; Flunkert et al., 2013).

b) Phosphorylation anormale de tau et pathologies

La phosphorylation de tau est une de ses modifications post-traductionnelles, tout comme la glycosylation, la prolyl cis-trans isomérisation, la glycation, la nitration, la polyamination, l'acétylation, la méthylation et l'ubiquitinylation. La phosphorylation de tau est régulée au cours du développement. Elle est plus importante au stade fœtal et diminue avec l'âge (Lovestone et Reynolds, 1997). Tau comporte 85 sites potentiellement phosphorylables. Ils sont principalement répartis au niveau du domaine riche en prolines, dans les répétitions et dans la queue C-terminale de tau. La phosphorylation de tau dans les séquences KXGS des motifs R1-R4 réduit son affinité pour les microtubules, ainsi que son activité promotrice de l'assemblage des microtubules *in vitro* (Gutske et al., 1992 ; Trinczek et al., 1995 ; Drewes et al., 1995 ; Drewes et al., 1997 ; Alonso et al., 2010). Cependant, certaines combinaisons de phosphorylations sur les motifs répétés du MTBD ou sur les séquences P2 et R' permettent de restaurer l'activité stabilisatrice de tau sur les microtubules (Kiris et al., 2011), suggérant une régulation très fine et complexe de tau en fonction des sites touchés. Plus d'une vingtaine de kinases peuvent phosphoryler tau, qui peuvent être divisées en trois groupes : les PDPK (Proline Directed Protein Kinases) dont Cdk5, GSK3 β , MAPK, SAPK (Stress Activated Protein Kinases), les non -PDPK, dont CaMKII, GSK3 β , MARK, PKA et les tyrosine kinases, dont les kinases Src (Sergeant et al., 2008 ; Hanger et al., 2009). *In vitro*, les phosphatases PP2A, PP2B et PP1 sont impliquées dans la déphosphorylation de tau (Gong et al., 1995 ; Ladner et al., 1996). PP2A présente une activité plus importante que les autres phosphatases dans les neurones (Liu et al., 2005). *In vitro*, la déphosphorylation par ces enzymes de protéines tau hyperphosphorylées restaure leur capacité à nucléer les microtubules et à les stabiliser (Wang et al., 1996).

La maladie d'Alzheimer est caractérisée par une agrégation de protéines tau hyper- ou anormalement phosphorylées (Brion et al., 1985 ; Grundke-Iqbal et al., 1986 ; Ihara et al., 1986). L'hyperphosphorylation de tau a lieu sur des sites qui peuvent être phosphorylés à la fois en condition physiologique et en condition pathologique. Elle se manifeste soit par une augmentation du nombre de ces sites, soit par l'augmentation du nombre de protéines

phosphorylées sur l'un de ces sites. La phosphorylation anormale correspond à celle observée sur certains sites uniquement en conditions pathologiques. Il existe donc une relation directe entre la phosphorylation anormale de tau et sa perte de fonction physiologique sur les microtubules mais il reste à déterminer si la phosphorylation est une cause ou une conséquence du processus d'agrégation. L'hyperphosphorylation de tau dans la maladie d'Alzheimer semble liée à l'augmentation de l'activité de kinases et à la diminution de l'activité de phosphatases (Trojanowski et Lee, 1995). De plus, l'hyperphosphorylation de tau augmenterait sa capacité à s'agréger (Grundke-Iqbal et al., 1986 ; Alonso et al., 2001 ; Liu et al., 2007). Il a également été montré *in vitro* que les formes hyperphosphorylées de tau se lient aux protéines tau normales au niveau de leur domaine de liaison aux microtubules, inhibant leur fonction et les entraînant dans leur agrégation (Alonso et al., 1994 ; Li et al., 2007 ; Cowan et al., 2010). De même, les protéines tau hyperphosphorylées séquestrent les protéines MAP1 et MAP2 et inhibent leur activité à promouvoir l'assemblage des microtubules *in vitro* (Alonso et al., 1997 ; Li et al., 2007), un mécanisme qui pourrait également participer à l'altération du cytosquelette neuronal dans des conditions pathologiques.

c) Autres modifications post-traductionnelles de tau impliquées dans les pathologies

Tau peut être ubiquitinylée. L'ubiquitylation est un processus cellulaire qui permet d'associer une chaîne polymérique d'ubiquitine (protéine à 76 acides aminés) à des protéines mal repliées ou altérées, les conduisant à la dégradation protéasomale. Les DNFs issues de cerveaux de patients Alzheimer montre un taux important de tau ubiquitinylé (Iqbal et Grundke-Iqbal, 1991). Dans ces mêmes cerveaux, l'activité du protéasome est diminuée et une mutation du gène codant pour l'ubiquitine a été identifiée dans la maladie d'Alzheimer (De Vrij et al., 2001). De plus, chez des souris transgéniques P301L et R406W, des mutations retrouvées dans les FTDP-17, les lésions neuronales sont fortement immunoréactives pour l'ubiquitine (Lewis et al., 2000 ; Tatebayashi et al., 2002).

De plus, les protéines tau extraites des cerveaux de patients présentent une O- et une N-glycosylation que l'on ne retrouve pas dans les cerveaux sains (Comer et Hart, 2000 ; Liu et al., 2002). La N-glycosylation se retrouve sur des protéines tau hyperphosphorylées, alors que la O-glycosylation est spécifique des tau non modifiées (Wang et al., 1996). La relation entre la phosphorylation de tau et sa O-glycosylation pourrait jouer un rôle dans sa

localisation nucléaire. En effet, il a été montré qu'en provoquant l'hyperphosphorylation de tau par une inhibition de l'activité des phosphatases, l'ajout de O-glycosylation sur les protéines tau diminuait, ainsi que la relocalisation de tau dans le noyau (Lefebvre et al., 2003). De plus, cette modification post-traductionnelle réduit l'affinité de tau pour la tubuline (Buée et al., 2000).

Les protéines tau retrouvées dans les agrégats subissent également une glycation (Yan et al., 1994 ; Münch et al., 2003). Cette glycation pourrait contribuer à la formation d'enchevêtrements neurofibrillaires insolubles (Nacharaju et al., 1997). De plus, il a été montré que l'introduction de tau glycatée dans des cultures cellulaires génère une libération de radicaux libres oxygénés capables d'altérer la fonction neuronale (Smith et al., 1995).

Il existe également d'autres modifications post-traductionnelles qui peuvent être impliquées dans l'agrégation de tau, comme la nitration ou la sulfatation. Le stress oxydatif est un potentiel facteur pathogénique dans la maladie d'Alzheimer qui augmente la nitration de tau, notamment au niveau de ses résidus tyrosine. Chez les patients atteints de MA, la concentration de nitrotyrosine est six fois supérieure à celle chez les personnes saines (Tohgi et al., 1999), et la nitration de tau a été montrée comme altérant ses fonctions *in vivo* et *in vitro* (Mailliot et al., 2000). La présence d'une ou deux cystéines dans les séquences respectives de tau3R et tau4R pourrait permettre à tau de former un dimère via la formation d'un pont disulfure (interactions SH-SH) intermoléculaire. Dans ce cas, l'oxydation de tau par un stress oxydatif permettrait l'oligomérisation de tau et augmenterait son agrégation (Schweers et al., 1995).

Il a également été proposé que les protéines tau puissent s'associer entre elles via une réaction enzymatique modulée par la transglutaminase, permettant la formation de liaisons covalentes entre des groupes amines libres (Dudek et Johnson, 1993 ; Miller et Johnson, 1995 ; Norlund et al., 1999). Des modifications impliquant des changements conformationnels de tau ont également lieu. Ils impliquent l'isomérisation cis-trans des prolines (Wedemeyer et al., 2002). La déamidation de tau au niveau des résidus asparagine et glutamine a également été décrite (Watanabe et al., 2000) et aurait un rôle dans l'agrégation de tau (Montejo de Garcini et al., 1986).

d) Troncation de tau

Des formes tronquées de tau ont été mises en évidence dans les cerveaux de patients atteints de la MA (Wang et al., 2010 ; Derisbourg et al., 2015). Ces produits de protéolyse de tau sont délétés de leur partie N-terminale et/ou C-terminale (Kovacech et Novak, 2010 ; Zilka et al., 2012). Parmi l'ensemble de ces formes tronquées, deux espèces principales ont été identifiées au niveau C-terminal : une forme tronquée se terminant au résidu glutamate 391 et une autre forme se terminant au résidu aspartate 421. Plusieurs enzymes de la famille des caspases voient leur expression augmenter dans les cerveaux de patients atteints de MA (Su et al., 2001 ; Rohn et al., 2002 ; Guo et al., 2004). Les caspases sont des protéases qui clivent les protéines au niveau de la séquence consensus DXXD. Ces enzymes font partie d'une cascade protéolytique qui conduit à la mort cellulaire via l'apoptose. La caspase 3 est responsable du clivage de tau au niveau du résidu 421 (Gamblin et al., 2003) et est la plus répandue dans les neurones (Cryns et al., 1997). Les protéines tau tronquées au niveau de l'aspartate 421 ont une efficacité d'auto-assemblage plus grande que les protéines tau entières (Gamblin et al., 2003 ; Berry et al., 2003). Des études basées sur des criblages immunohistologiques montrent que ces deux fragments sont retrouvés également dans la maladie de Pick (Guillozet-Bongaarts et al., 2007 ; Mondragon-Rodriguez et al., 2008). Un fragment de 17 kDa (A125-R230) a été décrit au sein de tissus cérébraux de patients atteints de MA ou d'autres tauopathies (Ferreira et Bigio, 2011). Récemment, deux sites de troncation dans le domaine N-terminal de tau ont été découverts : au niveau de la méthionine 11 et de la glutamine 124 (Derisbourg et al., 2015).

L'effet pathologique des fragments de tau tronqués en C-terminal a été étudié dans des cultures cellulaires et dans des modèles d'animaux transgéniques. La surexpression de la protéine tau tronquée provoque plusieurs altérations dans l'organisation et le fonctionnement des organelles, comme les mitochondries et le réticulum endoplasmique. Des exemples de mort cellulaire par apoptose ont également été reportés (Fasulo et al., 2005 ; Bandyopadhyay et al., 2007 ; Chun et Johnson, 2007 ; Matthews-Roberson et al., 2008 ; Quintanilla et al., 2012). De manière générale, les formes tronquées de tau ont des capacités agrégatives accrues par rapport à la protéine entière et constituent un composant majeur des PHFs (Derisbourg et al., 2015 ; pour revue : Gendron et Petrucelli, 2009 ; Zilka et al., 2012). Des études de caractérisations immunologiques des dégénérescences neurofibrillaires révèlent que la chronologie d'apparition des événements de troncation et d'agrégation n'est pas évidente

(Guillozet-Bongaarts et al., 2005 ; Kolarova et al., 2012), ne permettant pas de dire si la troncation de la protéine tau est antérieure ou postérieure à la formation de la DNF. Récemment, plusieurs études proposent que des fragments solubles de tau présentent des modifications conformationnelles qui conduisent à un gain de fonction, caractérisé par une sur-stimulation de la polymérisation de tubuline et/ou un effet de stabilisation des microtubules augmenté (Zilka et al., 2006 ; Derisbourg et al., 2015). Ainsi, ces formes tronquées solubles pourraient représenter des espèces toxiques dans la MA via un effet délétère sur cytosquelette.

On peut se demander pourquoi les fragments de tau ont des propriétés pro-agrégatives plus importantes que la protéine entière. Il a été montré que tau possède des séquences au sein du domaine de liaison aux microtubules qui auraient une forte tendance à s'organiser en structure secondaire de type feuillet β (Mukrasch et al., 2005) (Figure 30). Il s'agit des motifs PHF6* (²⁷⁵VQIINK²⁸⁰) et PHF6 (³⁰⁶VQIVYK³¹¹), connus également pour promouvoir l'agrégation de tau (von Bergen et al., 2000 ; von Bergen et al., 2001). Ce type de structure en feuillet β est une caractéristique commune aux protéines qui ont un pouvoir fibrillogénique (Soto, 2003 ; Tyedmers et al., 2010). Dans des conditions physiologiques et lorsque tau n'est pas liée aux microtubules, ces motifs seraient masqués par le domaine de projection qui recouvre le domaine C-ter de la protéine (voir figure 32). On peut penser que la troncation de tau au niveau de son domaine de projection N-terminal ou de sa queue C-terminale serait suffisante pour démasquer ces motifs pro-agrégatifs. Par ailleurs, quand tau est liée aux microtubules, ces motifs seraient enfouis dans la paroi du microtubule, entre les crêtes des protofilaments, et donc peu accessibles (Kadavath et al., 2015). Cela suggère que l'agrégation de tau nécessite son détachement des microtubules, celui-ci pouvant être dû à une phosphorylation anormale de tau. Les fragments générés par la troncation du domaine de projection et contenant les motifs PHF6* et PHF6 serviraient d'agents de nucléation dans les processus d'oligomérisation et d'agrégation de tau (Figure 39).

Le rôle de la troncation dans l'initiation de la fibrillogenèse de tau est soutenu par des études *in vitro* avec des protéines tau tronquées purifiées. Les résultats montrent que les fragments délétés de leur partie C-terminale mais contenant les répétitions R2 et R3 s'agrègent plus vite que les protéines tau intactes, et que la formation d'oligomères de celles-ci est catalysée par la présence des tau tronquées (Abraha et al., 2000 ; Gamblin et al., 2003 ;

Yin et Kuret, 2006). Ces observations *in vitro* confirment donc que le clivage de tau conduirait à la formation des DNFs observées au sein du tissu cérébral humain.

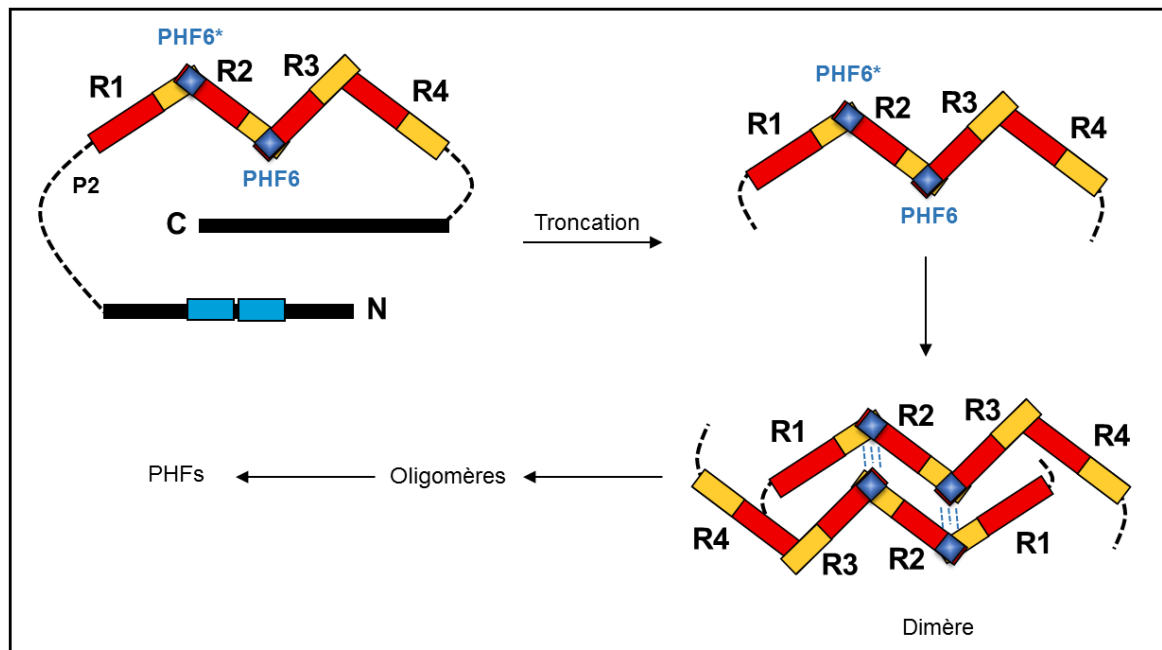


Figure 39. Modèle de démasquage des séquences pro-agrégatives de tau par la troncation et initiation de l'agrégation. Le domaine de projection de tau recouvre le domaine C-terminal contenant les séquences VQIINK (PHF6*) et VQIVYK (PHF6). La troncation de tau serait l'un des mécanismes par lequel ces séquences normalement inaccessibles se retrouvent démasquées. Les fragments issus de cette troncation serviraient d'agents de nucléation pour les oligomères de tau, dont l'accumulation donnera naissance aux PHFs insolubles (von Bergen et al., 2000 ; von Bergen et al., 2001).

En conclusion, bien que l'on sache depuis longtemps que tau est impliquée dans la stabilisation des microtubules et dans les processus neurodégénératifs, les fonctions de cette protéine dans le cerveau adulte et en développement ainsi que les mécanismes qui contribuent à la dysfonction neuronale et à la neurodégénérescence ne sont pas encore élucidés de façon précise. On ne sait pas, par exemple, si ce sont les formes oligomériques ou les agrégats filamenteux de tau qui sont les plus toxiques pour les neurones, ou si ce sont les formes intermédiaires de tau, encore solubles mais présentant des modifications post-traductionnelles inhabituelles, qui pourraient moduler la fonction normale de tau et/ou rendre la protéine disponible pour des localisations ou interactions neuronales anormales. Dans cette dernière hypothèse, la formation d'agrégats de tau pourrait apparaître comme un moyen de protection du neurone pour rendre ces formes solubles inactives.

Objectifs de la thèse

Comme on l'a vu précédemment, tau est une des premières MAPs neuronales à avoir été identifiée et, du fait de son implication dans la maladie d'Alzheimer, est extensivement étudiée depuis 40 ans. Elle a été initialement caractérisée comme étant capable de s'associer aux microtubules, de les stabiliser et de les organiser en faisceaux. Cependant, de nombreuses questions restent en suspens sur son mode d'action sur les microtubules, particulièrement sur le mécanisme par lequel tau organise les microtubules en faisceaux. A ce jour, plusieurs modèles ont été proposés dans la littérature pour expliquer ce processus, mais ils restent contradictoires et/ou manquent de preuve directe pour les étayer. En effet, le phénomène de formation de faisceaux microtubulaires est difficilement analysable dans les prolongements fins des neurones mais aussi dans les différents modèles cellulaires utilisés à ce jour, du fait de la densité importante des microtubules. L'altération de l'organisation des faisceaux de microtubules dans les neurones pourrait être une cause de la neurodégénérescence observée dans la maladie d'Alzheimer, d'où l'intérêt de comprendre les bases moléculaires de cette organisation par tau. Le premier objectif de ma thèse a donc été de répondre aux questions suivantes:

1/ Par quels mécanismes tau organise-t-elle les faisceaux de microtubules et régule-t-elle leur stabilité ?

D'autre part, tau s'est révélée être une protéine multifonctionnelle, ayant de nombreux partenaires autres que les microtubules. Ainsi, elle interagirait directement avec l'actine, même si, à ce jour, peu d'études ont été réalisées sur cette interaction qui reste controversée. Tau aurait donc un rôle potentiel dans la coordination des cytosquelettes de microtubules et d'actine, coordination essentielle au développement du neurone et son activité synaptique. Cette hypothèse m'a amenée à la deuxième partie de ma thèse :

2/ Tau est-elle impliquée dans la coordination microtubules/actine ? Si oui, quelles sont les conséquences sur les propriétés intrinsèques de ces deux réseaux lors de leur interaction ?

Ces études ont été menées en système reconstitué *in vitro* à partir de protéines purifiées et reposent sur la mise au point de conditions particulières pour suivre en direct la formation de faisceaux de microtubules ainsi que la polymérisation simultanée des microtubules et des filaments d'actine.

Chapitre II : Résultats (1)

Mécanismes moléculaires impliqués dans la formation de faisceaux de microtubules par tau

Résumé de l'article

L'organisation spatiale des microtubules en faisceaux dans les prolongements des neurones est essentielle à leur croissance et au maintien de leur architecture. Les faisceaux de microtubules ont également un rôle dans le transport sur de longues distances de vésicules neuronales contenant, par exemple, des neurotransmetteurs. Tau est une MAP neuronale principalement localisée au niveau de l'axone et dont le rôle dans la formation de faisceaux microtubulaires est connu depuis environ 25 ans. Cependant, les mécanismes moléculaires à la base de ce processus restent peu compris et controversés. Le but de cette étude a été de disséquer les mécanismes de formation de ces faisceaux induits par tau, grâce à la visualisation en temps réel par microscopie TIRF de faisceaux de microtubules reconstitués à partir de protéines purifiées. Cette étude nous a permis, dans un premier temps, de caractériser les paramètres de formation des faisceaux, puis, dans un deuxième temps, de déterminer, en utilisant diverses isoformes ou formes tronquées de tau, les domaines de la protéine nécessaires à cette organisation. Nous avons ainsi montré que tau est capable d'organiser des faisceaux de microtubules parallèles et/ou anti-parallèles, et pour un angle de rencontre entre deux microtubules inférieur à 25°. Les résultats obtenus grâce aux formes délétées de la protéine dans son domaine de projection ou dans son domaine de liaison aux microtubules révèlent que le domaine de projection de tau inhibe la formation des faisceaux de microtubules, alors que les deux hexapeptides responsables de la formation pathologique des fibres de tau (domaines PHFs, pour Paired Helical Filaments) sont des éléments clés dans ce phénomène. D'autre part, des différences dans les propriétés dynamiques de microtubules seuls ou inclus dans un faisceau indiquent qu'il y a une compétition entre l'activité stabilisatrice des motifs répétés de tau et leur activité de pontage des microtubules, confirmant le rôle de ces domaines dans l'établissement de ponts entre les microtubules. Par ailleurs, des tests d'oligomérisation de tau sur les microtubules suggèrent que l'absence du domaine de projection de tau stimule sa capacité à oligomériser sur le microtubule, alors que la délétion des séquences PHFs diminue fortement cette activité. En conclusion, nous proposons deux modèles permettant d'expliquer comment les domaines PHFs pontent les microtubules : soit en permettant la répartition des motifs répétés du MTBD sur deux polymères adjacents, soit via une dimérisation/oligomérisation de tau par ces domaines PHFs. Le domaine de projection de tau a un rôle inhibiteur dans le processus de formation des faisceaux, probablement dû à son repliement possible sur le MTBD et/ou à sa charge négative qui repousserait les microtubules également chargés négativement à leur surface.

Molecular mechanisms of microtubule bundling by tau: differential roles of tau's projection domain and repeat motifs.

Auréliane Elie^{1,2}, Elea Prezel^{1,2}, Julie Delaroche^{1,2}, Virginie Stoppin-Mellet^{1,2}, Laurence Serre^{1,2}, Christophe Bosc^{1,2}, Ninon Zala^{1,2}, Marylin Vantard^{1,2} and Isabelle Arnal^{1,2,*}

¹Inserm, U836, BP170, 38042 Grenoble, Cedex 9, France

²Université Grenoble Alpes, Grenoble Institut des Neurosciences, BP170, 38042 Grenoble, Cedex 9, France

Abstract

Proper microtubule organization in linear arrays is required for maintaining the polarized shape and functionality of neurons. Tau is a neuronal microtubule-associated protein that stimulates tubulin polymerization and is responsible for microtubule stabilization and bundling in axonal processes. Although the microtubule-binding and -stabilizing properties of tau have been extensively studied, the mechanisms by which tau spatially organizes microtubules remain elusive. To dissect how tau achieves microtubule bundling, we reconstituted self-organized bundles of growing microtubules in a minimal cell-free system. We found that tau is able to co-align and stably cross-link microtubules that contact at shallow-angle encounters, inducing a sustained elongation of bundles. The conserved hexapeptides, localized in the microtubule-binding repeats of tau and involved in tau aggregation in Alzheimer's disease, are key elements in this process. Whereas both hexapeptides contribute to microtubule stabilization, only the one located in the third repeat and present in all tau isoforms is required for the microtubule-bundling function of tau. Our results further demonstrate that tau's N-terminal projection domain is not necessary for microtubule bundling and rather plays a negative regulatory role by reducing both the bundling angles and frequency. Overall, our data provide a mechanistic model of tau-mediated microtubule co-alignment and give new insights into the coordination of the dual functions of tau in microtubule bundling and stabilization.

Introduction

Tau belongs to the microtubule-associated protein (MAP) family, which plays crucial roles in the regulation of microtubule properties. Tau acts as a promoter of tubulin nucleation and polymerization, stabilizes microtubules by inhibiting their shortening and organizes them into well-ordered linear arrays [1–7]. Tau protein is mainly expressed in the brain and is required to maintain the proper architecture and activity of neurons [8]. In Alzheimer's disease and related tauopathies, misregulation of tau affects its functions and drives its self-assembly and accumulation as paired helical filaments (PHFs) that further aggregate in neurofibrillary tangles [9,10].

Tau proteins comprise 6 isoforms that differ by the presence of 3 or 4 imperfect repeats (R) at their C-terminus and none, one or two small inserts (N) near their N-terminus [11,12]. All 6 isoforms are found in the adult brain with a 3R-/4R-tau ratio about 1, whereas only the shortest tau isoform with 3 repeats is expressed during the development [11,12]. Tau can be divided in three main regions: an acidic N-terminal projection domain, a microtubule-binding domain (MTBD) composed of 3 or 4 repeats flanked by a proline-rich and a pseudo-repeat regions, and a C-terminal tail (Fig. 1A). The MTBD is essential for the microtubule-binding and -assembly activities of tau [13–16], whereas the projection domain likely influences the microtubule interspacing within bundles [3] as well as tau association with the plasma membrane [17]. Despite its disordered and flexible structure, tau can adopt a global paperclip conformation in solution, characterized by the folding-back of its N- and C-terminal parts over the MTBD region [18,19]. In addition, local folding of tau within its repeat motifs affects its behaviour and functions. In particular, the two conserved hexapeptides (termed PHF domains) located at the beginning of the second (²⁷⁵VQIINK²⁸⁰) and third (³⁰⁶VQIVYK³¹¹) repeats are able to undergo a transition from disordered to beta-sheet structures, a mechanism responsible for tau oligomerisation and self-assembly in PHFs under pathological conditions [20,21]. By contrast, upon microtubule binding, each PHF domain folds into a hairpin conformation that anchors tau on the microtubule surface. Residues in-between the microtubule-binding hotspots of tau remain highly flexible, which may allow the protein to adopt variable shapes when bound to the microtubules [22].

The repeats and flanking regions directly contribute to the promotion of microtubule assembly [5,15,16,23]. Tau MTBD can interact with multiple tubulin dimers in solution and in the microtubule lattice, which likely stimulates microtubule nucleation, elongation and stability by reinforcing lateral/longitudinal tubulin contacts [24–28]. In addition to its tubulin-polymerization activity, one major function of tau is to assemble microtubules in linear arrays

that are required for the proper development and architecture of axons. Despite several studies describing the role of tau in microtubule organisation, the molecular basis of this process remains enigmatic. Initial works by electron microscopy allowed the visualisation of tau cross-bridges between adjacent bundled microtubules and proposed that tau's projection domain regulates the microtubule inter-spacing [3,29]. Along this line, dimerization of the projection domain has been hypothesized as a mechanism underlying tau-mediated microtubule bundling [30,31]. However, other studies have yielded contradictory results, showing that the N-terminal part of tau is not required for microtubule co-alignment or plays an inhibitory role in this process [23,32–34]. These later findings suggested that the MTBD is sufficient to induce microtubule bundles, through still unknown mechanisms. Furthermore, given the roles of tau in microtubule-bundling and -stabilizing properties, a tight coordination of both functions is required to regulate the organisation and plasticity of microtubule arrays. In order to identify the molecular players involved in this complex behaviour, we reconstituted in a minimal cell-free system the assembly and organisation of dynamic microtubule bundles in the presence of tau proteins.

Results

The bundling activity of tau was investigated in a real-time cell-free system using TIRF microscopy. Stable microtubule seeds (red) were elongated with fluorescent tubulin (green) in the absence or in the presence of recombinant 4R-tau isoform (including four microtubule-binding repeats) (Fig. 1A and B). Growing microtubules exhibited three types of behavior after collision, i.e. cross-over, touch-and-run and zippering events (Fig. 1B). With tubulin alone (8 μ M), microtubules were highly dynamic, alternating between phases of growth and shortening (Table S1, Movie S1), and we never observed microtubule bundling. In this condition, microtubule encounters resulted in cross-over (~50 %) or touch-and-run (~50 %) events. Addition of 100 nM 4R-tau strongly promoted microtubule elongation, as shown by the increase in the growth rate and rescue frequency together with the decrease in catastrophe events (Table S1, Movie S1). Encountering microtubules formed either cross-overs (75.1%) or bundles (24.7%), but very rarely underwent touch-and run events (0.2%). (Fig. 1C, Movie S1). Microtubule collisions at angles below 10 degrees almost invariably led to the formation of a bundle. This probability decreased to 70% and less than 10% for collision angles between 10 and 20 degrees and between 20 and 30 degrees, respectively (Fig. 1D). 4R-tau was not able to bundle microtubules encountering at angles more than 25 degrees and displayed no selectivity for microtubule polarity as suggested previously. Furthermore, bundled microtubules displayed similar dynamic properties than single ones, indicating that the microtubule-stabilizing activity of tau is not affected when the MAP crosslinks neighboring polymers (Table S1, see also Fig. 3E-G below). Therefore, 4R-tau is able to efficiently co-align and zipper microtubules that collide at shallow angles, leading to the formation of persistently growing microtubule bundles.

To investigate whether the N-terminal part and/or C-terminal tail of tau were required for microtubule bundling, we produced two fragments deleted from the projection domain (Δ N-tau) or the projection domain, the proline-rich domain P2 and the C-terminal tail (Δ NC-tau) (Fig. 2A). Both fragments promoted microtubule elongation similarly than the full-length protein (Table S1), although microtubules polymerized with the minimal form (Δ NC-tau) exhibited a higher catastrophe frequency, as reported previously [5]. In the presence of Δ N- and Δ NC-tau, collisions between growing microtubules led to either cross-over (64%) or zippering events (36%) (Fig. 2B and C, Movie S2). Detailed analysis of bundling events revealed that the two fragments increased the probability of microtubule bundling per encountering angles (Fig. 2D) and enabled microtubule co-alignments at significantly steeper

angles compared to 4R-tau (up to 50 and 35 degrees respectively, Fig. 2B and E). In addition, we did not observe any changes in the dynamical properties of microtubules following their co-alignment induced by Δ N- or Δ NC-tau (Table S1, see also below Fig. 3E-G). We thus concluded that the N- and C-terminal parts of tau are not necessary for tau's microtubule-bundling activity, in agreement with initial electron microscopy studies [32,33]. Our results rather suggest that the projection domain negatively regulates the bundling efficiency of tau by decreasing both the bundling angle and bundling frequency. We next wondered whether tau constructs lacking the projection domain might induce structural changes in the microtubule lattice that could explain their increased capacity to cross-link the polymers. Indeed, defects within the microtubule wall and/or variations in the protofilament number have been suggested to locally modulate the microtubule mechanical properties, influencing the spatial organization of microtubule arrays [35–38]. To address this issue, we investigated whether 4R-tau and Δ N-tau affect microtubule lattice structure by cryo-electron microscopy (Fig. 2F). With tubulin alone, the microtubule population essentially consists of 13 protofilaments (Fig. 2G). For assembly in the presence of 4R- and Δ N-tau, the population shifted toward a majority of microtubules with 14 protofilaments and a few with 15 and 16 protofilaments, without major changes in the lattice defect frequencies (Fig. 2G). Such an increase in the protofilament number may account for the microtubule stiffening properties that have been reported for tau and shorter fragments encompassing the 4 repeats [39]. We also measured the microtubule inter-spacing within 4R- and Δ N-tau-induced bundles and found similar values of 9.60 ± 0.23 and 10.78 ± 0.27 respectively (mean $\pm$ sem). Thus, the full-length 4R-tau and its deleted form Δ N-tau similarly influenced the lattice organization of growing microtubules by increasing their protofilament number.

Since the minimal Δ NC-tau fragment was sufficient to bundle microtubules, we next focused on the role of the repeat motifs in this process. We produced various mutants lacking one or two repeats, or the PHF domains that have been recently identified as major players in the stabilization of the microtubule-bound conformation of tau (Fig. 3A) [22]. All constructs interacted to similar extent with microtubules under the low tau:tubulin ratios used in our TIRF assay, in agreement with the implication of both the repeat motifs and flanking regions in microtubule binding (Fig. S1) [5,40]. We first asked whether the number of repeats influenced tau's bundling function. We found that 3R-tau was still able to cross-link microtubules with a global proportion of bundling of 31%, while the proportion of zippering events strongly decreased down to 6% in the presence of 2R-tau (Fig. 3B, Movie S3). In both

cases, we noticed the apparition of touch-and-run events (6 and 19% with 3R- and 2R-tau respectively), correlating with the reduced microtubule-stabilizing activity of tau when the number of repeats decreases (Table S1, see also movie S3) [5]. Detailed analysis of zippering events showed no major differences between 3R- and 4R-tau, whereas 2R-tau dramatically reduced the frequency of microtubule bundling per encountering angles and the median value of bundling angles (Fig. 3C and D, Movie S3). Thus, whereas the deletion of R3 only affected microtubule stability, the removal of both R2 and R3 strongly impaired microtubule bundling. Interestingly, in the presence of a tau mutant lacking the two PHF sequences (Δ PHF12-tau), growing microtubules behaved similarly than with 2R-tau, undergoing mainly cross-over (64%) and touch-and-run (26%) events (Fig. 3B, see also Movie S3). Microtubules co-aligned only at small collision angles ($<13^\circ$) and with a low frequency (Fig. 3C and D). Increasing the amount of 2R- and Δ PHF12- by 2 to 3 fold was not sufficient to restore microtubule bundling, indicating that the reduced bundling activity of these mutants was not caused by a decreased number of repeat motifs bound to microtubules (Fig. S2, Movie S4). Since the removal of the two central repeats or the two hexapeptides also impaired microtubule stabilization (Table S1), we wondered whether the dynamicity of microtubules might alter the bundling activity of these deleted forms. To test this hypothesis, microtubules were polymerized at a higher tubulin concentration (17 μ M) than that used in the above experiments (8 μ M), ensuring the growth of longer and less dynamic polymers in the presence of 2R- and Δ PHF12-tau (Fig. S3D). Although 4R-tau was still able to bundle microtubules in these conditions, we observed a strong reduction of the bundling frequencies and median values of bundling angles of microtubules co-polymerized with either 2R- or Δ PHF12-tau (Fig. S3A-C, Movie S5). Overall, these results indicated a specific and key role of the PHF sequences in tau's microtubule-bundling activity.

To determine the contribution of the two different hexapeptides in the bundling function of tau, we next examined the effect of Δ PHF6*- and Δ PHF6-tau lacking the hexapeptide located in R2 and R3, respectively. Both mutants displayed a reduced microtubule-stabilizing activity compared to the full-length tau (Table S1). However, the deletion of the first PHF domain only slightly affected tau bundling activity, whereas the deletion of the second PHF strongly decreased both microtubule bundling angles and frequency (Fig. 3B-D, Movie S6). These results indicated that the PHF sequences are not equivalent regarding microtubule-bundling and -stabilizing activities. The PHF domain at the beginning of R3 plays a central role in microtubule bundling as well as in microtubule

stabilization, whereas the one at the beginning of R2 mainly affects microtubule dynamic properties. Importantly, only tau constructs with 4 repeats could maintain their microtubule-stabilizing activity while bundling microtubules. For all other proteins lacking at least one PHF domain, microtubules became more dynamic as they formed bundles, growing slower (Fig. 3E) and exhibiting more catastrophes (Fig. 3F) and fewer rescues (Fig. 3G, see also kymographs in Fig. 3H). This suggested that the formation of bundles is detrimental to microtubule stabilization unless the two PHF domains are present. Consequently, tau proteins containing only the PHF domain in R3 (3R- and Δ PHF6*-tau), and which still efficiently co-align microtubules, are able to produce dynamic bundles (Movie S3 and S4).

Interestingly, the PHF domains are responsible for tau-tau interaction by folding into beta-sheet structures, a process involved in tau aggregation in pathological conditions [20,21]. Several studies have also reported the formation of tau dimers and oligomers upon microtubule binding, which could form bridges between microtubules and induce bundles [41–43]. To test the role of the PHF domain in microtubule-dependent oligomerisation of tau, taxol-stabilized microtubules were co-sedimented with increasing amount of 4R-, Δ N-, Δ NC-, 2R- and Δ PHF12-tau. As reported previously, 4R-tau displayed a biphasic binding behavior in these conditions (Fig. 3I, black curve). It has been proposed that the linear and non-saturable rise of the second phase depends on tau-tau interaction onto the microtubule surface [41]. Interestingly, the slope of this second phase is enhanced in the presence of Δ N- and Δ NC-tau (Fig. 3I, blue curves) but decreased with 2R- and Δ PHF12-tau (Fig. 3I, orange curves). Thus, the microtubule-dependent oligomerisation of tau proteins correlates with their efficiency to bundle microtubules and is strongly affected by the absence of the PHF domains.

Discussion and conclusion

Despite extensive studies motivated by the role of tau in both physiological and pathological conditions, key questions remain open regarding the microtubule-regulating functions of this neuronal MAP. These last years, substantial progresses have been made in understanding how tau binds to microtubules. However, the molecular mechanisms underlying the dual roles of tau in both microtubule bundling and stabilization remain unclear. Here, we reconstituted in vitro self-organization of growing microtubules in the presence of tau. We found that tau is able to co-align microtubules that contact at shallow angles to produce persistent growing bundles. The selection of low angle encounters for bundling might facilitate microtubule co-alignment in small-size compartments, a property well suited to the role of tau in thin axonal processes. We identified the two hexapeptides localized in the repeat motifs as key elements in the co-alignment of microtubules and stabilization of the resulting bundles (Figure 3). Whereas the first PHF domain (at the beginning of R2) mainly affects microtubule dynamic properties, the second one (at the beginning of R3) plays a central role in microtubule bundling as well as microtubule stabilization. Recent studies have highlighted the role of the PHF motifs in microtubule binding via the formation of a hairpin like-conformation behaving as a hook to anchor tau molecules in the microtubule wall [19,22]. We thus propose a model in which the PHF domain located in R3 represents a major anchor point on the microtubule surface, influencing the conformation of nearby flexible stretches [19] to ensure the projection of other repeats or microtubule -binding “hot-spots” onto the adjacent polymer (Fig. 4A, left). The efficient stabilization of bundles would require the binding of at least one PHF domain per microtubule, as suggested by the increased dynamics of microtubules when they are cross-linked by tau proteins lacking one repeat or hexapeptide. Alternatively, tau could bundle microtubules by forming dimers and/or oligomers via the hexapeptide domains (Fig. 4A, right), as suggested by the ability of PHF sequences to self-assemble [20,21] and the PHF-dependent oligomerisation of tau onto the microtubule surface (Fig. 3I). Such a model assumes that at least one PHF domain of one tau molecule detaches from the microtubule surface to interact with one PHF of an adjacent tau molecule located onto a neighboring microtubule. The local increase in tau concentration when two microtubules encounter and co-align might favor tau-tau self-interactions [21,41]. The higher propensity of the second PHF (within R3) to oligomerise compared to the one in R2 is in agreement with the central role of this PHF domain in microtubule bundling [20,44,45].

The differential behavior of the two PHF domains render possible to dissociate the microtubule-bundling and -stabilizing functions of tau. Along this line, 3R- and Δ PHF6*-tau proteins lacking the PHF domain in R2 are still able to efficiently cross-link microtubules but exhibit a decreased microtubule stabilizing effect, consequently inducing the formation of dynamic bundled polymers (Movies S3 and S4). Importantly, the presence of the second hexapeptide (at the beginning of R3) in both 3R- and 4R-tau strongly suggests that the microtubule-bundling function of tau is conserved in all isoforms. This might be a prerequisite for the normal development and maintenance of axons together with fine-tuning of microtubule dynamics by changes in the 3R-/4R-tau ratio [46,47], allowing local fluctuations in bundle stability.

We further show that neither the N-terminal part nor the C-terminal tail of tau is required for microtubule bundling (Fig. 2). Our results rather suggest that the projection domain negatively modulates the bundling efficiency of tau since its deletion strongly stimulates the bundling angle and bundling frequency. Microtubules co-polymerized with the full-length 4R-tau or the fragment lacking the projection domain (Δ N-tau) exhibited a similar lattice organization (Fig. 2F and G), indicating that the increased ability of Δ N-tau to bundle microtubules likely results from the intrinsic properties of truncated tau and not a specific effect on microtubule structure. According to the paperclip conformation of tau [18,19], the folding-back of the projection domain onto the MTBD could constrain the flexibility of the repeats required for their distribution and/or oligomerisation between two adjacent microtubules (Fig. 4B). Along this line, recent NMR studies have reported long-range intramolecular interactions between the second hexapeptide in R3 and both the N- and C-terminal part of tau [19]. In addition, the acidic character of the projection domain could also down regulate tau-bundling efficiency by increasing the repulsive forces between the negative charged surfaces of encountering microtubules, as already suggested [48]. Several studies have proposed a direct negative impact of the N-terminal part of tau on its microtubule-based functions such as tubulin polymerization and microtubule stabilization and bundling [32,33,49,50]. Overall these results suggest that the cleavage of tau's projection domain confers a gain of function to the protein, which might alter the cytoskeleton and neuronal integrity in Alzheimer's disease brains where N- and C-terminally truncated tau fragments have been identified [51,52].

In conclusion, our results provide a first detailed molecular picture of how tau organizes growing microtubules into bundles and further demonstrate that the microtubule-bundling and -stabilizing activities of the neuronal MAP can be dissociated. Phosphorylation is known to affect the microtubule-stabilizing properties of tau as well as its global paperclip conformation. Site-specific phosphorylation within the projection domain and/or the repeat motifs might thus also regulate tau-dependent co-alignment of microtubules. Deciphering how such regulative pathways coordinate the dual roles of tau in microtubule bundling and stabilization represents a key issue to understand the normal and pathological functions of tau.

Methods

DNA constructs and reagents

We used tau isoforms containing three or four repeats (R) and on insert (N), respectively named 3R- and 4R-tau and subcloned in the pDEST17 vector. The following tau constructs were generated by a PCR-based strategy (amino-acid numbers are given according to the longest 2N4R-tau isoform): Δ N-tau and Δ NC-tau, corresponding to amino acids S198-L441 and Q244-S400 respectively; 2R-tau, corresponding to the deletion of R2 and R3 (V275-Q336); Δ PHF6*-tau, Δ PHF6-tau and Δ PHF12-tau in which V275-K280, V306-K311, and both sequences were deleted respectively. Δ N-tau and Δ NC-tau were subcloned in the pET-28a vector. When not stated, reagents were from Sigma.

Protein purification

His-tagged recombinant tau proteins were expressed in E. Coli BL21-DE3-pLysS (constructs cloned in pET-28a) or BL21-AI (constructs cloned in pDEST17) bacteria (Invitrogen). Δ N- and Δ NC-Tau fragments expression was induced by 3 h incubation with 1 mM IPTG at 37°C. Expression of the other forms were induced by overnight incubation with 0.2 % L-arabinose at 18°C. Soluble proteins were extracted from cells in lysis buffer (40 mM Tris-HCl, 500 mM NaCl, protease inhibitor 1X, pH 7) by three freeze/thaw cycles and sonication. The clarified lysates were added to Talon metal affinity resin (Clontech) for one hour at 4 degrees in Buffer A (20 mM Tris-HCl, 500 mM NaCl, 10 mM imidazole, 0.1 % Triton, pH 7). After three washes in buffer A, proteins were eluted with buffer A supplemented with 200 mM imidazole. Samples were further processed by size exclusion chromatography in BRB80 buffer (80 mM Pipes, 1 mM EGTA, 1 mM MgCl₂, pH 6.74) and proteins were concentrated and frozen in liquid nitrogen. Protein concentrations were determined by a Bradford assay using BSA as a standard.

Tubulin was purified from fresh bovine brain by one assembly-disassembly cycle followed by cation-exchange chromatography. ATTO-488-, ATTO-595-labeled tubulin (ATTO-TEC GmbH, Germany) and biotinylated tubulin were prepared according to Hyman et al (1991) [53].

Preparation of taxol-stabilized microtubules

70 μ M tubulin were incubated with 1 mM GTP in BRB80 buffer for 40 min at 35°C, diluted two-fold in BRB80 buffer supplemented with 100 μ M taxol and further incubated for 30 min

at 35°C. Microtubules were next centrifuged for 5 min at 230,000 x g and resuspended in the same volume of BRB80 buffer supplemented with 10 μ M taxol

Microtubules and tau co-sedimentation assay

To estimate the amount of tau bound to microtubules under the tau:tubulin ratio used in the TIRF assay, microtubules were self-assembled in the presence of tau proteins in BRB80 buffer supplemented with 50 mM KCl (BRB80-K) with 1 mM GTP at 35°C and at a tau:tubulin molar ratio of 1:100. After 30 min incubation, microtubules were centrifuged for 30 min at 230,000 x g onto a 60% sucrose cushion in BRB80 buffer. The quantities of tubulin and tau recovered in the pellet and supernatant were analysed by SDS-PAGE and western blotting respectively. The amounts of polymerized tubulin and tau bound to microtubules were determined by densitometry on Coomassie-stained gels and immunoblots respectively.

To evaluate microtubule-dependent oligomerisation of tau, 1 μ M of taxol-stabilized microtubules were incubated with increasing concentrations of tau (0.5 μ M to 20 μ M) in BRB80-K Buffer supplemented with 10 μ M taxol and 4 mM DTT, for 30 min at 35°C. Mixtures were centrifuged at 240,000 x g for 20 min and the amount of tau bound to pelleted microtubules were quantified by densitometry on Coomassie-stained SDS-PAGE gel.

Microtubule bundling assay by TIRF microscopy

Preparation of perfusion chambers. Slides and coverslips were sonicated 30 min in acetone, successively incubated in acetone (30 min) and ethanol (15 min), rinsed with ultrapure water, further incubated during 2 h in Hellmanex III (2% in water, Hellma) and rinsed in ultrapure water. Slides were dried and incubated overnight at room temperature under gentle agitation in a solution of silane-PEG (30kDa, creativePEGwork) at 1 mg/ml in ethanol. Coverslips were dried, passivated in a plasma cleaner (FEMTO, Diener Electronics) during 3 min at 60 mW and incubated overnight in a solution of silane-PEG-biotin (3.5 kDa, LaysanBio) at 1 mg/ml in ethanol 96° and 0.02 % of HCl. Slides and coverslips were then successively washed in ethanol and ultrapure water, dried and stored at 4°C. Passivated slides and coverslips were then mounted with double-sided tape to form a flow chamber of a volume around 20 μ l.

Microtubule seeds preparation. Microtubule seeds were obtained by polymerizing 10 μ M tubulin (50 % biotinylated tubulin and 50 % ATTO-565 labeled tubulin) in the presence of 1 mM GMPCPP in BRB80 at 35°C for 1 h. Microtubule seeds were then centrifuged for 5 min

at 68,000 x g, resuspended in an equal volume of BRB80 supplemented with 1 mM GMPCPP and stored in liquid.

Microtubule bundling assay. The flow cell was successively perfused with neutravidin (25 µg/ml in 1% BSA) (Pierce), PLL-g-PEG (2 kDa, 0.1 mg/ml in 10 mM Hepes, pH 7.4) (Jenkem), BSA (1 % in BRB80-K buffer) and microtubule seeds. Microtubules assembly was then initiated with 8 µM tubulin (containing 30% ATTO 488-labeled tubulin and 70% black tubulin) in the presence of 100 nM of various tau proteins in the TIRF assay buffer (4 mM DTT, 1% BSA, 50 mM KCl, 1 mg/ml glucose, 70 µg/ml catalase, 580 µg/ml glucose oxidase, 0.017 % methylcellulose (1500 centipoise) in BRB80). This methylcellulose concentration results in a low viscosity medium, allowing the formation of microtubule bundles. Dual-color time-lapse imaging was performed on an inverted Eclipse Ti (Nikon) microscope with an Apochromat 60X1.49 N.A oil immersion objective (Nikon), equipped with an ilas2 TIRF system (Roper Scientific), a cooled charged-coupled device camera (EMCCD Evolve 512, Photometrics) and was controlled by the MetaMorph 7.7.5 software (Molecular Devices). For excitation we used 491- and 561-nm lasers and time-lapse imaging was performed at 1 frame per 5 s with a 80 ms exposure time during at least 45 min.

Microtubule bundling and dynamics analysis

All image analysis was performed in Image J [54]. Microtubule dynamic parameters were determined on kymographs using a homemade KymoTool. Growth and shrinkage rates were calculated from the slopes of microtubule growing and shrinking phases. The catastrophe and rescue frequencies were obtained by dividing the number of events per microtubule by the time spent in growing and shrinking states, respectively. The contact angles between encountering microtubules were measured manually on the movie frames for each outcome (bundling, cross-over and touch-and-run). Event frequencies were calculated for contact angle ranges of 10° and from 0° to 90°. The total numbers of events for microtubules assembled with 8 µM tubulin and 0.1 µM tau proteins (pooled from at least three experiments) were: 287 (8 µM tubulin alone), 986 (100 nM 4R-tau), 292 (100 nM ΔN-Tau), 344 (100 nM ΔNC-tau), 412 (3R-tau), 230 (2R-tau), 536 (ΔPHF6*-tau), 413 (ΔPHF6-tau) and 256 (ΔPHF12-tau).

Microtubule growth rate measurements in self-assembly conditions

Microtubules were assembled from 60 µM tubulin (10 % ATTO-488 labeled tubulin and 90 % black tubulin) or 20 µM tubulin in the presence of 5 µM 4R-tau in BRB80-K buffer supplemented with 1 mM GTP. Tubulin assembly was initiated at 35 °C and assembly was

stopped after 2 min incubation by adding 1 ml of BRB80 containing 0.5 % glutaraldehyde and 25 % (weight/volume) sucrose. Microtubules were then centrifuged on coverslips, fixed in methanol, washed in PBS-Tween 0.1% and observed under an epifluorescence microscope. Microtubule lengths were determined using ImageJ software. At least 100 microtubule lengths were measured on each coverslip.

Cryo-electron microscopy

Vitreous-ice-embedded microtubules were prepared under controlled temperature/humidity atmosphere using the vitrification robot Vitrobot MARK IV (FEI company). Microtubules were polymerized for at least 10 min at 35°C from 60 μ M tubulin alone or a mix of 20 μ M tubulin and 5 μ M 4R-tau or Δ N-tau. 4 μ L of samples were dropped on holey-carbon grids within the warm and humid chamber of the Vitrobot, blotted and plunged into liquid ethane. Specimens were observed under low-dose conditions using a transmission electron microscope FEI Tecnai F20 200kV FEG equipped with a FEI eagle 4K CCD camera.

Microtubule lattice organization was analyzed on printed images based on the specific fringe moiré pattern resulting from the 2D projection of protofilaments [55]. Microtubules with 13 unskewed protofilaments display a continuous image contrast. For all other configuration, microtubule images are characterized by alternating fringe patterns that vary according to the protofilament number. Microtubule length was measured with an electronic ruler (Silva) and used to determine the proportion of microtubule populations. The total length of microtubules measured in each condition was at least 300 μ m. Distances between microtubules within bundles was measured in image J.

Statistics

All statistical analyses were done using Prism 6 (GraphPad software, USA).

References

1. Weingarten MD, Lockwood AH, Hwo SY, Kirschner MW (1975) A protein factor essential for microtubule assembly. *Proc Natl Acad Sci U S A* **72**: 1858–1862.
2. Cleveland DW, Hwo SY, Kirschner MW (1977) Purification of tau, a microtubule-associated protein that induces assembly of microtubules from purified tubulin. *J Mol Biol* **116**: 207–225.
3. Chen J, Kanai Y, Cowan NJ, Hirokawa N (1992) Projection domains of MAP2 and tau determine spacings between microtubules in dendrites and axons. *Nature* **360**: 674–677.
4. Drechsel DN, Hyman AA, Cobb MH, Kirschner MW (1992) Modulation of the dynamic instability of tubulin assembly by the microtubule-associated protein tau. *Mol Biol Cell* **3**: 1141–1154.
5. Trinczek B, Biernat J, Baumann K, Mandelkow EM, Mandelkow E (1995) Domains of tau protein, differential phosphorylation, and dynamic instability of microtubules. *Mol Biol Cell* **6**: 1887–1902.
6. Binder LI, Frankfurter A, Rebhun LI (1985) The distribution of tau in the mammalian central nervous system. *J Cell Biol* **101**: 1371–1378.
7. Brandt R, Lee G (1993) The balance between tau protein's microtubule growth and nucleation activities: implications for the formation of axonal microtubules. *J Neurochem* **61**: 997–1005.
8. Avila J, Lucas JJ, Perez M, Hernandez F (2004) Role of tau protein in both physiological and pathological conditions. *Physiol Rev* **84**: 361–384.
9. Friedhoff P, von Bergen M, Mandelkow EM, Mandelkow E (2000) Structure of tau protein and assembly into paired helical filaments. *Biochim Biophys Acta* **1502**: 122–132.
10. Goedert M, Spillantini MG (2006) A century of Alzheimer's disease. *Science* **314**: 777–781.
11. Himmler A, Drechsel D, Kirschner MW, Martin DW (1989) Tau consists of a set of proteins with repeated C-terminal microtubule-binding domains and variable N-terminal domains. *Mol Cell Biol* **9**: 1381–1388.
12. Goedert M, Jakes R (1990) Expression of separate isoforms of human tau protein: correlation with the tau pattern in brain and effects on tubulin polymerization. *EMBO J* **9**: 4225–4230.
13. Lee G, Neve RL, Kosik KS (1989) The microtubule binding domain of tau protein. *Neuron* **2**: 1615–1624.
14. Goode BL, Feinstein SC (1994) Identification of a novel microtubule binding and assembly domain in the developmentally regulated inter-repeat region of tau. *J Cell Biol* **124**: 769–782.
15. Gustke N, Trinczek B, Biernat J, Mandelkow EM, Mandelkow E (1994) Domains of tau protein and interactions with microtubules. *Biochemistry (Mosc)* **33**: 9511–9522.
16. Goode BL, Denis PE, Panda D, Radeke MJ, Miller HP, Wilson L, Feinstein SC (1997) Functional interactions between the proline-rich and repeat regions of tau enhance microtubule binding and assembly. *Mol Biol Cell* **8**: 353–365.
17. Brandt R, Léger J, Lee G (1995) Interaction of tau with the neural plasma membrane mediated by tau's amino-terminal projection domain. *J Cell Biol* **131**: 1327–1340.

18. Jeganathan S, von Bergen M, Brutlach H, Steinhoff H-J, Mandelkow E (2006) Global hairpin folding of tau in solution. *Biochemistry (Mosc)* **45**: 2283–2293.
19. Mukrasch MD, Bibow S, Korukottu J, Jeganathan S, Biernat J, Griesinger C, Mandelkow E, Zweckstetter M (2009) Structural polymorphism of 441-residue tau at single residue resolution. *PLoS Biol* **7**: e34.
20. von Bergen M, Friedhoff P, Biernat J, Heberle J, Mandelkow EM, Mandelkow E (2000) Assembly of tau protein into Alzheimer paired helical filaments depends on a local sequence motif ((306)VQIVYK(311)) forming beta structure. *Proc Natl Acad Sci U S A* **97**: 5129–5134.
21. von Bergen M, Barghorn S, Biernat J, Mandelkow E-M, Mandelkow E (2005) Tau aggregation is driven by a transition from random coil to beta sheet structure. *Biochim Biophys Acta* **1739**: 158–166.
22. Kadavath H, Jaremko M, Jaremko Ł, Biernat J, Mandelkow E, Zweckstetter M (2015) Folding of the Tau Protein on Microtubules. *Angew Chem Int Ed Engl* **54**: 10347–10351.
23. Fauquant C, Redeker V, Landrieu I, Wieruszeski J-M, Verdegem D, Laprévotte O, Lippens G, Gigant B, Knossow M (2011) Systematic identification of tubulin-interacting fragments of the microtubule-associated protein Tau leads to a highly efficient promoter of microtubule assembly. *J Biol Chem* **286**: 33358–33368.
24. Al-Bassam J, Ozer RS, Safer D, Halpain S, Milligan RA (2002) MAP2 and tau bind longitudinally along the outer ridges of microtubule protofilaments. *J Cell Biol* **157**: 1187–1196.
25. Kar S, Fan J, Smith MJ, Goedert M, Amos LA (2003) Repeat motifs of tau bind to the insides of microtubules in the absence of taxol. *EMBO J* **22**: 70–77.
26. Santarella RA, Skinotis G, Goldie KN, Tittmann P, Gross H, Mandelkow E-M, Mandelkow E, Hoenger A (2004) Surface-decoration of microtubules by human tau. *J Mol Biol* **339**: 539–553.
27. Gigant B, Landrieu I, Fauquant C, Barbier P, Huvent I, Wieruszeski J-M, Knossow M, Lippens G (2014) Mechanism of Tau-promoted microtubule assembly as probed by NMR spectroscopy. *J Am Chem Soc* **136**: 12615–12623.
28. Li X-H, Culver JA, Rhoades E (2015) Tau Binds to Multiple Tubulin Dimers with Helical Structure. *J Am Chem Soc* **137**: 9218–9221.
29. Hirokawa N, Shiomura Y, Okabe S (1988) Tau proteins: the molecular structure and mode of binding on microtubules. *J Cell Biol* **107**: 1449–1459.
30. Kanai Y, Chen J, Hirokawa N (1992) Microtubule bundling by tau proteins in vivo: analysis of functional domains. *EMBO J* **11**: 3953–3961.
31. Rosenberg KJ, Ross JL, Feinstein HE, Feinstein SC, Israelachvili J (2008) Complementary dimerization of microtubule-associated tau protein: Implications for microtubule bundling and tau-mediated pathogenesis. *Proc Natl Acad Sci U S A* **105**: 7445–7450.
32. Scott CW, Klika AB, Lo MM, Norris TE, Caputo CB (1992) Tau protein induces bundling of microtubules in vitro: comparison of different tau isoforms and a tau protein fragment. *J Neurosci Res* **33**: 19–29.
33. Brandt R, Lee G (1993) Functional organization of microtubule-associated protein tau. Identification of regions which affect microtubule growth, nucleation, and bundle formation

in vitro. *J Biol Chem* **268**: 3414–3419.

34. Preuss U, Biernat J, Mandelkow EM, Mandelkow E (1997) The ‘jaws’ model of tau-microtubule interaction examined in CHO cells. *J Cell Sci* **110** (Pt 6): 789–800.
35. Gittes F, Mickey B, Nettleton J, Howard J (1993) Flexural rigidity of microtubules and actin filaments measured from thermal fluctuations in shape. *J Cell Biol* **120**: 923–934.
36. Kikumoto M, Kurachi M, Tosa V, Tashiro H (2006) Flexural rigidity of individual microtubules measured by a buckling force with optical traps. *Biophys J* **90**: 1687–1696.
37. Portran D, Zoccoler M, Gaillard J, Stoppin-Mellet V, Neumann E, Arnal I, Martiel JL, Vantard M (2013) MAP65/Ase1 promote microtubule flexibility. *Mol Biol Cell* **24**: 1964–1973.
38. Schaedel L, John K, Gaillard J, Nachury MV, Blanchoin L, Théry M (2015) Microtubules self-repair in response to mechanical stress. *Nat Mater*.
39. Felgner H, Frank R, Biernat J, Mandelkow EM, Mandelkow E, Ludin B, Matus A, Schliwa M (1997) Domains of neuronal microtubule-associated proteins and flexural rigidity of microtubules. *J Cell Biol* **138**: 1067–1075.
40. Mukrasch MD, von Bergen M, Biernat J, Fischer D, Griesinger C, Mandelkow E, Zweckstetter M (2007) The ‘jaws’ of the tau-microtubule interaction. *J Biol Chem* **282**: 12230–12239.
41. Ackmann M, Wiech H, Mandelkow E (2000) Nonsaturable binding indicates clustering of tau on the microtubule surface in a paired helical filament-like conformation. *J Biol Chem* **275**: 30335–30343.
42. Makrides V, Shen TE, Bhatia R, Smith BL, Thimm J, Lal R, Feinstein SC (2003) Microtubule-dependent oligomerization of tau. Implications for physiological tau function and tauopathies. *J Biol Chem* **278**: 33298–33304.
43. Duan AR, Goodson HV (2012) Taxol-stabilized microtubules promote the formation of filaments from unmodified full-length Tau in vitro. *Mol Biol Cell* **23**: 4796–4806.
44. Sahara N, Maeda S, Murayama M, Suzuki T, Dohmae N, Yen S-H, Takashima A (2007) Assembly of two distinct dimers and higher-order oligomers from full-length tau. *Eur J Neurosci* **25**: 3020–3029.
45. Ganguly P, Do TD, Larini L, LaPointe NE, Sercel AJ, Shade MF, Feinstein SC, Bowers MT, Shea J-E (2015) Tau assembly: the dominant role of PHF6 (VQIVYK) in microtubule binding region repeat R3. *J Phys Chem B* **119**: 4582–4593.
46. Panda D, Samuel JC, Massie M, Feinstein SC, Wilson L (2003) Differential regulation of microtubule dynamics by three- and four-repeat tau: implications for the onset of neurodegenerative disease. *Proc Natl Acad Sci U S A* **100**: 9548–9553.
47. Bunker JM, Wilson L, Jordan MA, Feinstein SC (2004) Modulation of microtubule dynamics by tau in living cells: implications for development and neurodegeneration. *Mol Biol Cell* **15**: 2720–2728.
48. Mukhopadhyay R, Hoh JH (2001) AFM force measurements on microtubule-associated proteins: the projection domain exerts a long-range repulsive force. *FEBS Lett* **505**: 374–378.
49. Zilka N, Filipcik P, Koson P, Fialova L, Skrabana R, Zilkova M, Rolkova G, Kontseikova E, Novak M (2006) Truncated tau from sporadic Alzheimer’s disease suffices to drive neurofibrillary degeneration in vivo. *FEBS Lett* **580**: 3582–3588.

50. Derisbourg M, Leghay C, Chiappetta G, Fernandez-Gomez F-J, Laurent C, Demeyer D, Carrier S, Buée-Scherrer V, Blum D, Vinh J, et al. (2015) Role of the Tau N-terminal region in microtubule stabilization revealed by new endogenous truncated forms. *Sci Rep* **5**: 9659.
51. Wang Y, Garg S, Mandelkow E-M, Mandelkow E (2010) Proteolytic processing of tau. *Biochem Soc Trans* **38**: 955–961.
52. Zilka N, Kovacech B, Barath P, Kontsekova E, Novák M (2012) The self-perpetuating tau truncation circle. *Biochem Soc Trans* **40**: 681–686.
53. Hyman A, Drechsel D, Kellogg D, Salser S, Sawin K, Steffen P, Wordeman L, Mitchison T (1991) Preparation of modified tubulins. *Methods Enzymol* **196**: 478–485.
54. Schneider CA, Rasband WS, Eliceiri KW (2012) NIH Image to ImageJ: 25 years of image analysis. *Nat Methods* **9**: 671–675.
55. Wade RH, Chrétien D, Job D (1990) Characterization of microtubule protofilament numbers. How does the surface lattice accommodate? *J Mol Biol* **212**: 775–786.

Figure legends

Figure 1. In vitro reconstitution of tau-mediated microtubule bundling. A) Schematic representation of tau. Tau consists of an N-terminal projection domain, a microtubule-binding domain (MTBD) and a C-terminal tail. The projection domain includes the N-terminal part of the protein and a proline-rich domain (P1). The MTBD is composed of a proline-rich domain (P2), four repeats (R1 to R4) and a pseudo-repeat (R'). The two conserved hexapeptides PHF6* and PHF6 are localised at the beginning of R2 and R3, respectively. B) TIRF microscopy time series showing the three types of outcomes occurring upon microtubule collisions: cross-over, touch-and-run and zippering. White arrowheads indicate the two microtubules involved in the various events. Time (min:sec) represents the beginning of the event. Schematic representations of each outcome are indicated below the sequences. C) Global proportions of the three outcomes between microtubules assembled with tubulin alone (8 μ M) and in the presence of 100 nM 4R-tau. D) Distributions of the frequency of bundling events between microtubules as a function of their collision angles in the presence of 4R-tau.

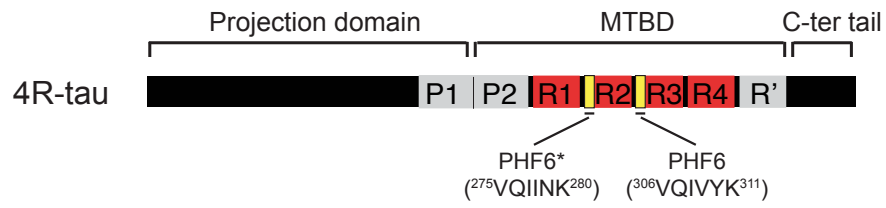
Figure 2. The deletion of tau's projection domain increases the efficiency of tau to bundle microtubules. A) Schematic representation of tau proteins lacking the projection domain (Δ N-tau) or the projection domain, P2 and the C-terminal tail (Δ NC-tau). B) TIRF microscopy time series of microtubule growing in the presence of 4R-, Δ N- and Δ NC-tau. Coloured arrowheads indicate the microtubules that co-align after collision. Time (min:sec) represents the beginning of the event. C) Global proportions of the three types of encountering events observed in the presence of 4R-, Δ N-, and Δ NC-tau. D) Distributions of the frequency of bundling events between microtubules as a function of their collision angles in the presence of 4R-, Δ N- and Δ NC-tau. E) Angle values at which microtubules co-align in the presence of 4R-, Δ N- and Δ NC-tau. Boxes represent 25-75 percentiles and the whiskers extend from the minimum to the maximum values. Statistical analysis was performed using a non-parametric Kruskal-Wallis ANOVA test. P values are calculated in comparison to the 4R-tau condition. F) Cryo-electron microscopy images of single microtubules (left) and bundled microtubules (right) assembled in the presence of 4R-tau. G) Distribution of microtubule populations polymerized in the absence and in the presence of 4R- or Δ N-tau. 20 μ M tubulin was assembled in the presence of 5 μ M 4R-tau or Δ N-tau. Since pure tubulin alone hardly self-assemble at 20 μ M, microtubules polymerized from 60 μ M tubulin were used as a control. In this condition, the initial elongation rate is comparable to the one observed for microtubules assembled with 20 μ M tubulin and 5 μ M 4R-tau (3.6 ± 0.1 and $3.7 \pm 0.1 \mu\text{m} \cdot \text{min}^{-1}$, respectively, as determined by spin-down assays).

Figure 3. The PHF sequences at the beginning of R2 and R3 are required to produce stable bundled microtubules. A) Schematic representation of tau proteins lacking one repeat (3R-tau), two repeats (2R-tau) or the PHF domains (Δ PHF12-, Δ PHF6*- and Δ PHF6-tau). B) Global proportions of

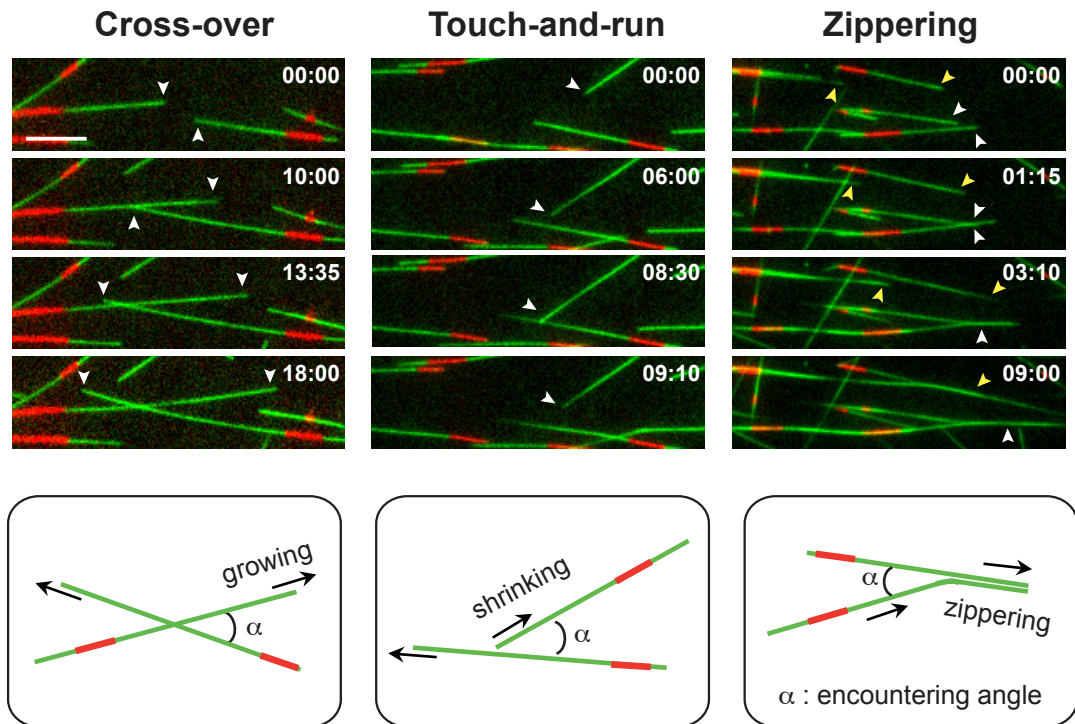
cross-over, touch-and-run and zippering events observed in the presence of the different tau proteins. C) Distributions of bundling frequencies as a function of microtubule collision angles in the presence of the different tau proteins. D) Angle values at which microtubules co-align in the presence of tau proteins. Boxes represent 25-75 percentiles and the whiskers extend from the minimum to the maximum values. Statistical analysis was performed using a non-parametric Kruskal-Wallis ANOVA test. P values are calculated in comparison to the 4R-tau condition. (E-G) comparison of the growth rate (E), catastrophe frequency (F) and rescue frequency (G) in single and bundled microtubules polymerized in the presence of 4R-, Δ N-, 3R-, Δ PHF12-, Δ PHF6*- and Δ PHF6-tau (see Table S1 for detailed values). Parameters of single versus bundled microtubules were compared using the Mann-Whitney test for each condition. S, single; B, bundled. H) Kymograph examples of microtubules growing in the presence of 4R-tau (left) and Δ PHF6-tau (middle and right). White dotted lines represent the growing extremities of microtubules and white arrowheads indicate the decrease in the growth rate observed when single microtubules form a bundle. White asterisks point catastrophe events. Horizontal scale bars, 10 μ m, and vertical scale bars, 5 min. I) Co-sedimentation assays of tau proteins in the presence of increasing amounts of taxol-stabilized microtubules. The biphasic binding curves have been calculated in the presence of 4R-tau (black), Δ N- and Δ NC-tau (dark and light blue), 2R- and Δ PHF12-tau (dark and light orange).

Figure 4. Models for tau-mediated microtubule bundling. A) The MTBD is responsible for the microtubule-bundling function of tau. The PHF domain at the beginning of R3 (PHF6) might represent a major anchor point on the microtubule surface and ensure the projection of other repeats or microtubule-binding “hot-spots” onto the adjacent polymer (left, see the text for details). Efficient stabilization of bundled microtubules requires one PHF per polymer. Alternatively, tau could bundle microtubules via the dimerization/oligomerisation of the PHF sequences (right). B) The projection domain negatively regulates tau’s microtubule-bundling function. Its possible folding-back onto the MTBD might constrain the flexibility of the repeats, resulting in microtubule bundling only for shallow-angle encounters. Electrostatic repulsions between the negatively charged projection domain and microtubule surface could also participate to the down-regulation of tau’s bundling activity. i, flexibility of the projection domain allowing its folding onto the MTBD.

A



B



C

	Tubulin	Tubulin + 4R-tau
Cross-over	51.2 %	75.1 %
Touch-and-run	48.8 %	0.2 %
Zippering	0 %	24.7 %

D

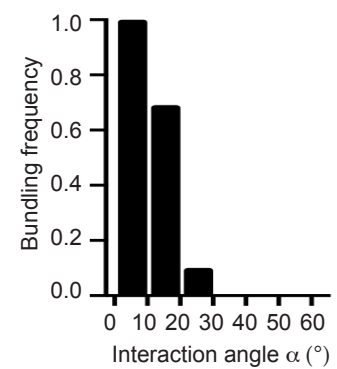


Figure 1

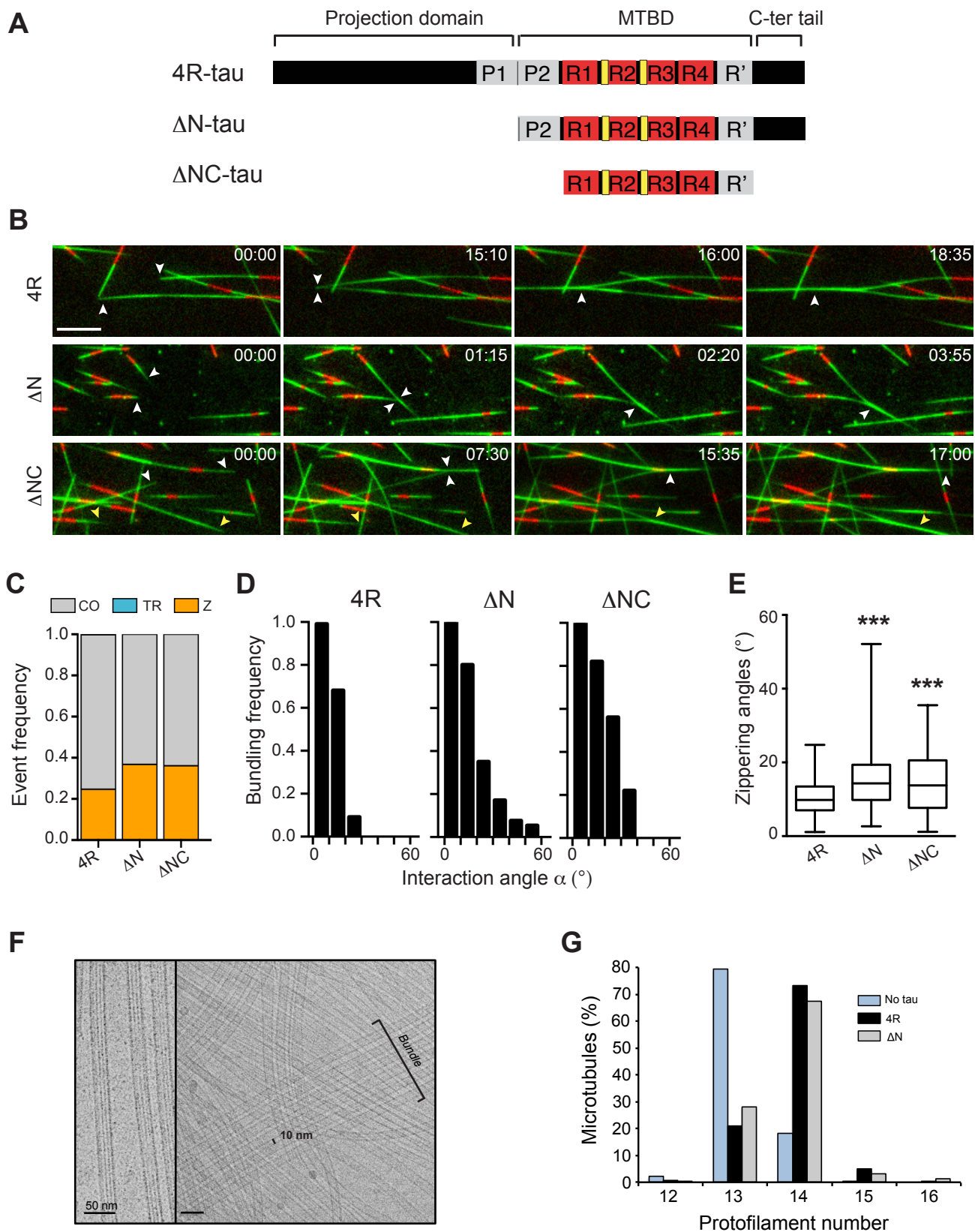


Figure 2

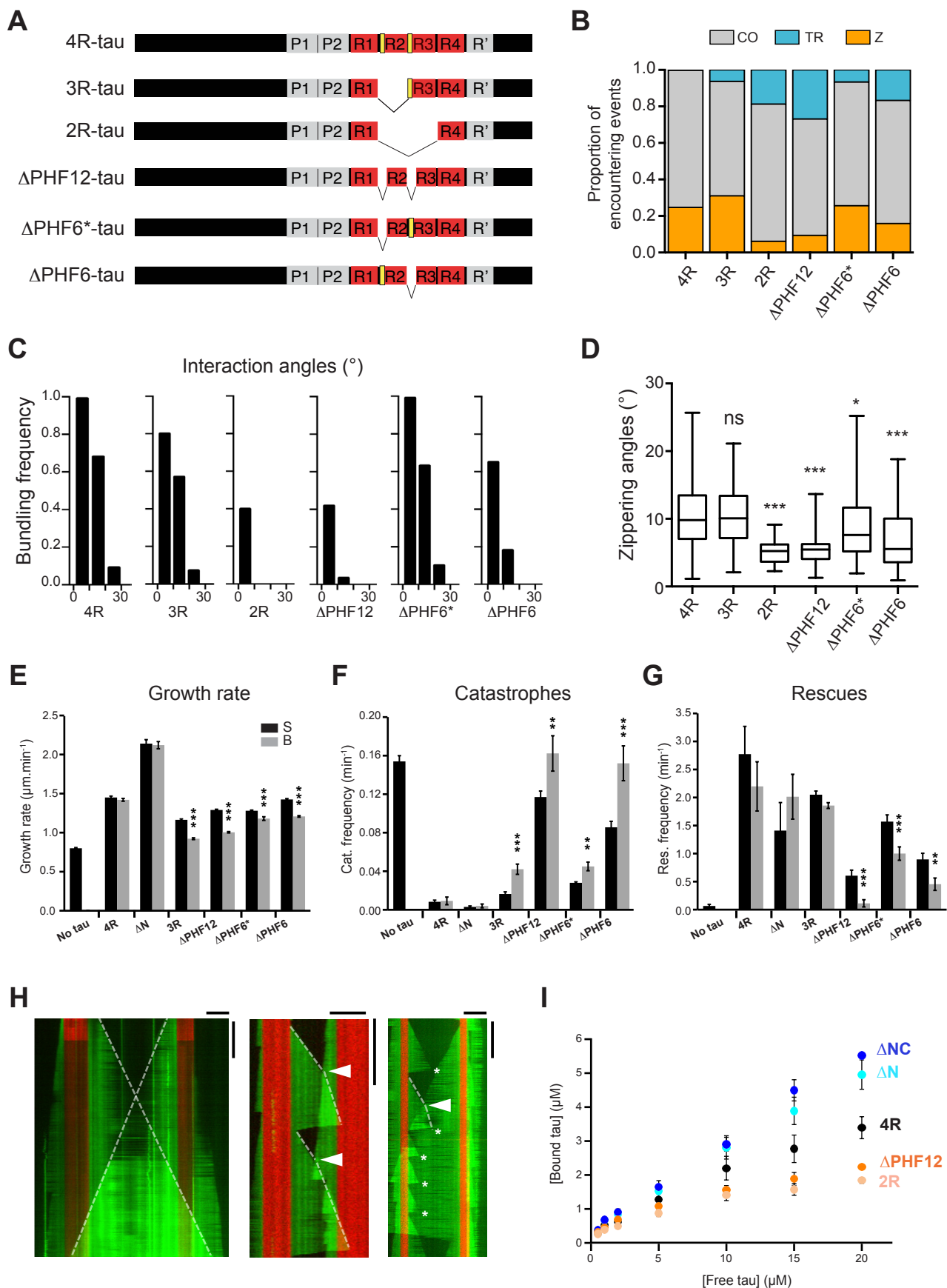
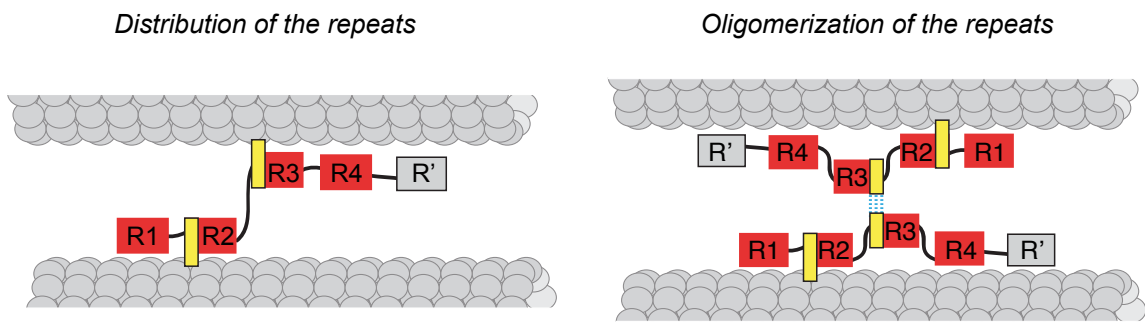


Figure 3

A Role of the PHF domains in tau-bundling function



B Effect of the projection domain on tau-bundling function

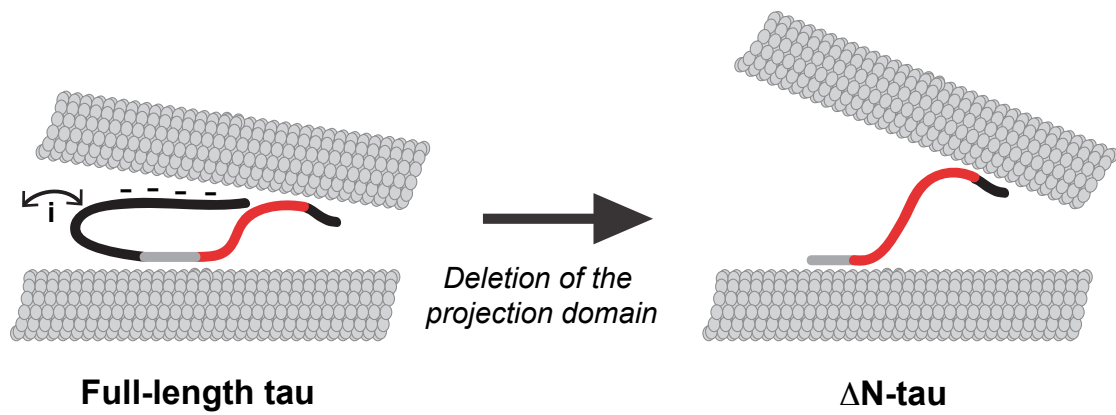


Figure 4

Supplementary Figure Legends

Supplementary Table 1. Effect of tau proteins on parameters of microtubule dynamics.

Microtubules were assembled from seeds with tubulin ($8\ \mu\text{M}$) in the presence of different tau proteins ($100\ \text{nM}$). Growing and shortening rates, catastrophe and rescue frequencies were calculated from kymographs of single and bundled microtubules. Values represent the mean $\pm$ sem. Numbers in parenthesis represent the total number of measurements for the growing and shortening rates and the total number of observed events for catastrophe and rescue frequencies. S, single microtubule; B, bundled microtubule; N/A, not applicable.

Supplementary Figure 1. Determination of the amount of tau proteins bound to microtubules.

A) Coomassie-stained SDS-PAGE gel displaying all purified tau proteins used in this study. Same amounts of proteins ($1.4\ \mu\text{g}$) were loaded. B) Co-sedimentation assays of microtubules co-assembled with tau proteins. Tau proteins were incubated with tubulin at 1:100 ratio of tau:tubulin dimers and co-sedimented. Tubulin and tau recovered in the pellet (P) and supernatant (SN) were revealed by Coomassie-stained SDS-PAGE and western blotting, respectively. C) Amounts of tau molecules bound to 100 molecules of polymerized tubulin dimers. The initial tubulin concentration was increased up to $60\ \mu\text{M}$ for 2R-, ΔPHF12 - and ΔPHF6 -tau, which have lesser microtubule-stabilizing and -nucleating effects. Values are given as the mean $\pm$ sem (three to six independent experiments).

Supplementary Figure 2. Increasing 2R- and ΔPHF12 -tau concentrations is not sufficient to restore tau's microtubule-bundling activity.

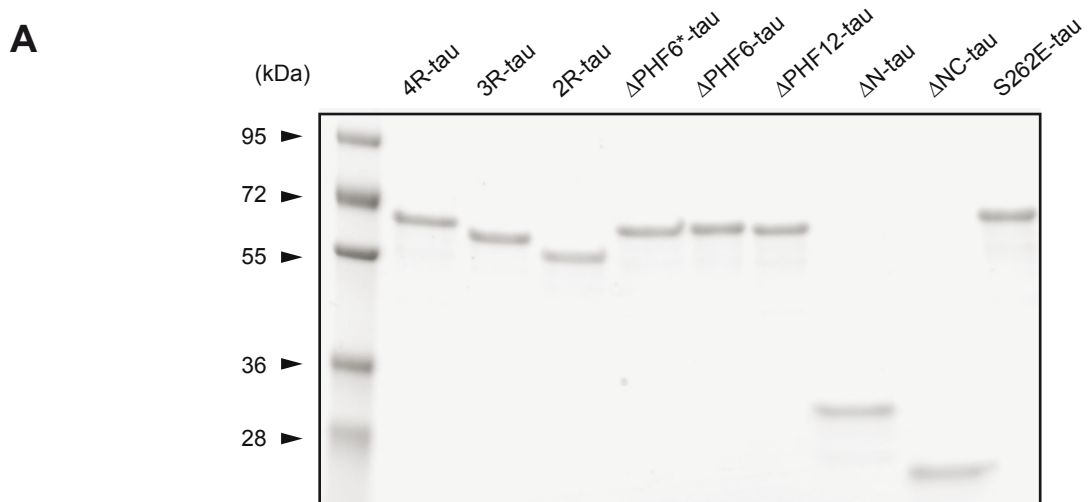
A) Global proportions of encountering events between microtubules assembled from $8\ \mu\text{M}$ tubulin and 4R-tau ($100\ \text{nM}$), 2R-tau ($300\ \text{nM}$) or ΔPHF12 -tau ($200\ \text{nM}$). Total numbers of events: 986 (2R-tau), 698 (2R-tau) and 267 (ΔPHF12). B) Distributions of bundling frequencies as a function of microtubule collision angles in the presence of 4R-, 2R- and ΔPH12 -tau. C) Angle values at which microtubules co-align in the presence of 4R-, 2R- and ΔPH12 -tau. Boxes represent 25-75 percentiles and the whiskers extend from the minimum to the maximum values. Statistical analysis was performed using a non-parametric Kruskal-Wallis ANOVA test followed by post-hoc Dunn comparisons. P values are calculated in comparison to the 4R-tau condition. D) Dynamical parameters of microtubules polymerized from tubulin ($8\ \mu\text{M}$) in the presence of 2R-tau ($300\ \text{nM}$). Values represent the mean $\pm$ sem. Numbers in parenthesis represent the

total number of measurements for the growing and shortening rates and the total number of observed events for the catastrophe and rescue frequencies.

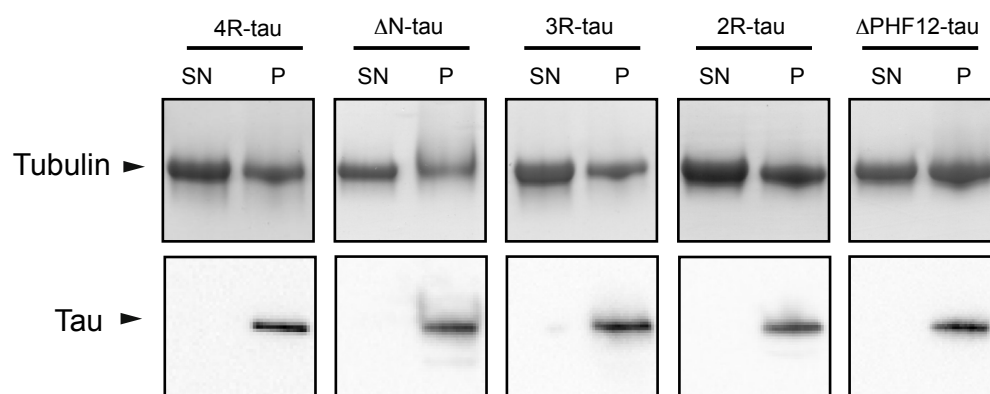
Supplementary Figure 3. Effects of 4R-, 2R- and Δ PHF12-tau on microtubule behavior at a tau:tubulin ratio of 1:560. A) Global proportions of encountering events between microtubules assembled from 17 μ M tubulin and 4R-, 2R- or Δ PHF12-tau (30 nM). Total numbers of events: 613 (4R-tau), 353 (2R-tau) and 444 (Δ PHF12). B) Distributions of the bundling frequencies as a function of microtubule collision angles in the presence of the different tau proteins. C) Angle values at which microtubules co-align in the presence of 4R-, 2R- and Δ PH12-tau. Boxes represent 25-75 percentiles and the whiskers extend from the minimum to the maximum values. Statistical analysis was performed using a non-parametric Kruskal-Wallis ANOVA test followed by post-hoc Dunn comparisons. P values are calculated in comparison to the 4R-tau condition. D) Dynamical parameters of microtubules polymerized with tubulin (17 μ M) in the absence of in the presence of 4R-, 2R- and Δ PH12-tau (30 nM). Values indicate the mean $\pm$ sem. Numbers in parenthesis represent the total number of measurements for the growing and shortening rates and the total number of observed events for catastrophe and rescue frequencies.

Supplementary Table 1

	Growth rate ($\mu\text{m}.\text{min}^{-1}$)	Shortening rate ($\mu\text{m}.\text{min}^{-1}$)	Fcat (min^{-1})	Fres (min^{-1})	MT (n)
Tubulin	0.80 ± 0.009 (252)	19.37 ± 0.50 (210)	0.154 ± 0.006 (415)	0.07 ± 0.03 (10)	(92)
4R (S)	1.45 ± 0.017 (180)	15.00 ± 0.95 (21)	0.008 ± 0.002 (31)	2.77 ± 0.50 (31)	(136)
4R (B)	1.42 ± 0.018 (147)	14.30 ± 0.72 (15)	0.009 ± 0.004 (13)	2.19 ± 0.44 (13)	(84)
ΔN (S)	2.14 ± 0.050 (83)	16.01 (1)	0.003 ± 0.001 (4)	1.41 ± 0.5 (4)	(74)
ΔN (B)	2.12 ± 0.046 (95)	18.01 ± 2.35 (6)	0.004 ± 0.003 (5)	2.01 ± 0.40 (5)	(65)
ΔNC (S)	1.51 ± 0.015 (192)	17.34 ± 0.95 (36)	0.018 ± 0.003 (80)	2.32 ± 0.19 (100)	(156)
ΔNC (B)	1.47 ± 0.031 (241)	17.48 ± 0.72 (92)	0.024 ± 0.003 (88)	1.91 ± 0.17 (105)	(155)
3R (S)	1.16 ± 0.011 (234)	12.90 ± 0.35 (60)	0.016 ± 0.002 (82)	2.05 ± 0.22 (79)	(163)
3R (B)	0.92 ± 0.011 (275)	19.31 ± 0.23 (112)	0.042 ± 0.005 (115)	1.86 ± 0.20 (102)	(162)
2R (S)	1.09 ± 0.009 (268)	23.2 ± 0.46 (218)	0.136 ± 0.007 (182)	0.20 ± 0.10 (12)	(43)
2R (B)	NA	NA	NA	NA	NA
ΔPHF12 (S)	1.29 ± 0.009 (298)	20.7 ± 0.58 (240)	0.117 ± 0.006 (333)	0.61 ± 0.10 (100)	(68)
ΔPHF12 (B)	1.00 ± 0.020 (72)	34.6 ± 1.76 (42)	0.162 ± 0.018 (64)	0.11 ± 0.06 (3)	(29)
ΔPHF6^* (S)	1.27 ± 0.011 (343)	16.11 ± 0.36 (176)	0.028 ± 0.001 (143)	1.57 ± 0.13 (144)	(160)
ΔPHF6^* (B)	1.18 ± 0.016 (259)	18.91 ± 0.45 (149)	0.044 ± 0.005 (133)	1.00 ± 0.13 (95)	(120)
ΔPHF6 (S)	1.42 ± 0.009 (443)	21.3 ± 0.34 (335)	0.086 ± 0.006 (252)	0.90 ± 0.11 (135)	(110)
ΔPHF6 (B)	1.20 ± 0.017 (129)	28.8 ± 0.94 (97)	0.152 ± 0.011 (101)	0.45 ± 0.11 (27)	(59)



B



C

tau / tub	4R-tau	ΔN-tau	ΔNC-tau	3R-tau	2R-tau	ΔPHF12-tau	ΔPHF6*-tau	ΔPHF6-tau
0.3 / 30	2.00 ± 0.06	1.85 ± 0.07	3.31 ± 0.14	2.35 ± 0.26	-	-	3.71 ± 0.17	-
0.6 / 60	1.74 ± 0.26	-	-	-	2.66 ± 0.21	1.73 ± 0.05	-	2.43 ± 0.02

Figure S1

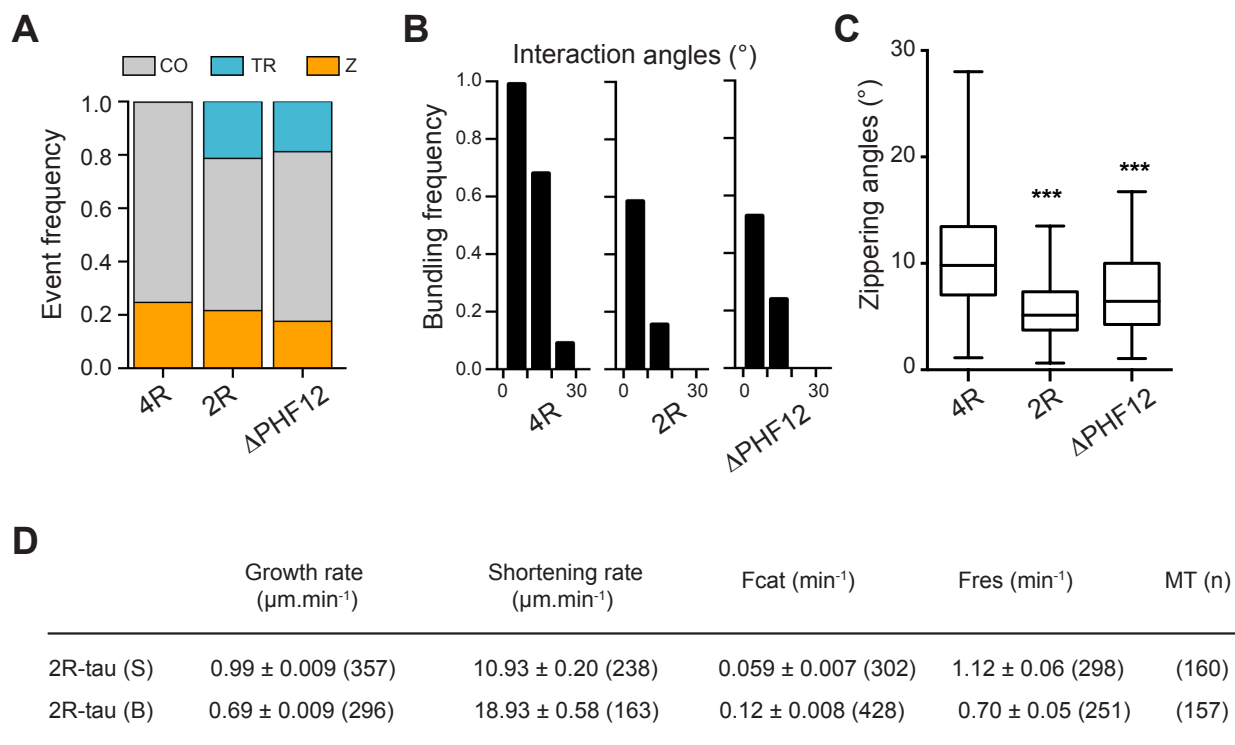


Figure S2

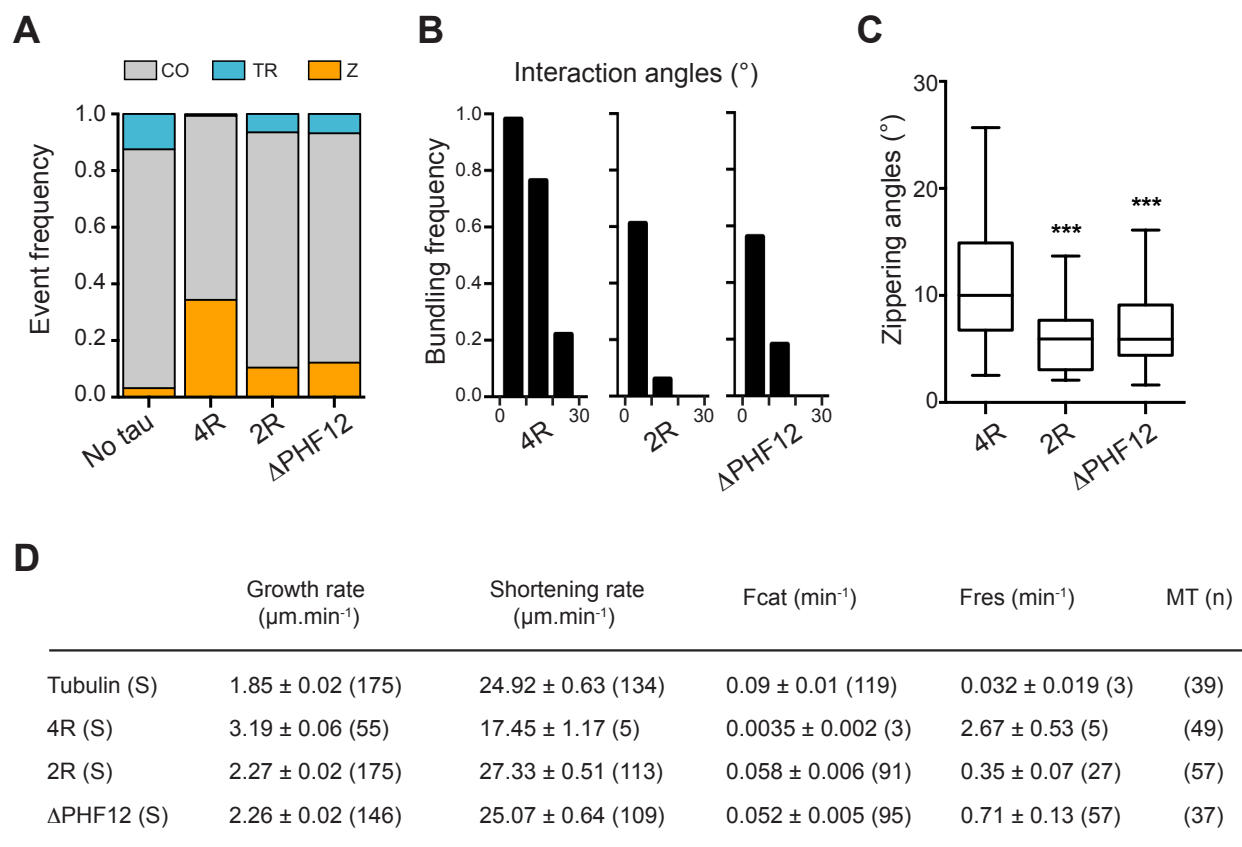


Figure S3

Supplementary Movie Legends

Supplementary Movie S1. Tau mediates the co-alignment of growing microtubules at shallow-angle encounters. TIRF movies of microtubules polymerized from seeds (red) and 8 μM tubulin (green) in the absence (top) or in the presence (bottom) of 0.1 μM 4R-tau. The time (min:s) indicates the elapsed time from the start of acquisition. Scale bar, 10 μm .

Supplementary Movie S2. Removal of the projection domain increases tau's microtubule-bundling efficiency. TIRF movies of microtubules polymerized from seeds (red) and 8 μM tubulin (green) in the presence of 0.1 μM 4R-, ΔN - and ΔNC -tau. White stars indicate microtubules co-aligning at steep angles ($>30^\circ$). The time (min:s) represents the elapsed time from the start of the events. Scale bar, 10 μm .

Supplementary Movie S3. Deletion of the two central repeats or the PHF domains strongly affects tau's bundling activity. TIRF movies of microtubules polymerized from seeds (red) and 8 μM tubulin (green) in the presence of 0.1 μM 4R-, 3R-, 2R- and ΔPHF12 -tau. White stars indicate dynamic bundled microtubules with 3R- and short life-time bundles with 2R- and ΔPHF12 -tau. The time (min:s) represents the elapsed time from the start of the acquisition. Scale bar, 10 μm .

Supplementary Movie S4. Increasing 2R- and ΔPHF12 -tau concentrations is not sufficient to restore tau's microtubule-bundling activity. TIRF movies of microtubules polymerized from seeds (red) and 8 μM tubulin (green) in the presence of 0.3 μM 2R-tau and 0.2 μM ΔPHF12 -tau. White stars indicate examples of bundles. The time (min:s) represents the elapsed time from the start of the acquisition. Scale bar, 10 μm .

Supplementary Movie S5. Effects of 4R-, 2R- and ΔPHF12 -tau on microtubule behavior at a tau:tubulin ratio of 1:560. TIRF movies of microtubules polymerized from seeds (red) and 17 μM tubulin (green) in the presence of 0.03 μM 4R-, 2R- and PHF12-tau. The time (min:s) represents the elapsed time from the start of the acquisition. Scale bar, 10 μm .

Supplementary Movie S6. The two PHF domains differentially contribute to tau's microtubule-bundling activity. TIRF movies of microtubules polymerized from seeds (red) and 8 μ M tubulin (green) in the presence of 0.1 μ M Δ PHF6*- and Δ PHF6-tau. The time (min:s) represents the elapsed time from the start of the acquisition. Scale bar, 10 μ m.

Résultats complémentaires

Nous nous sommes demandé si les résultats obtenus *in vitro* montrant l'importance de certains domaines de tau dans la formation des faisceaux de microtubules étaient transposables dans les cellules. En effet, contrairement aux différentes protéines tau purifiées utilisées pour suivre ce processus en microscopie TIRF, les protéines exprimées dans les cellules peuvent subir des modifications post-traductionnelles, notamment des phosphorylations, susceptibles de modifier le comportement de tau vis-à-vis des microtubules. D'autre part, l'étude des faisceaux de microtubules dans les cellules offre l'avantage de s'affranchir de la dynamique des microtubules puisqu'avant la transfection par les protéines tau, le réseau de microtubules est déjà établi (notamment par d'autres MAPs déjà présentes) et donc les microtubules possèdent une longueur globalement identique entre les cellules exprimant des protéines tau aux effets stabilisateurs différents.

Nous avons comparé les quantités de faisceaux de microtubules formés dans des cellules COS-7 surexprimant différentes formes de tau. Ces cellules contiennent une quantité très faible de tau endogène. Les différentes constructions de tau transfectées (4R-tau, Δ N-tau, 2R-tau et Δ PHF12-tau) sont fusionnées à la GFP. La GFP seule est utilisée comme contrôle. Pour l'analyse, les microtubules en faisceaux et les microtubules seuls ont été distingués grâce à un masque différenciant les deux catégories suivant l'épaisseur des filaments, puis la proportion de faisceaux par rapport à la quantité totale de microtubules par cellule a été calculée pour chaque tau (Figure 40). Les résultats montrent que 4R-tau et Δ N-tau induisent la formation d'environ 30 % de faisceaux de microtubules, alors que les faisceaux formés avec 2R-tau ou Δ PHF12-tau sont significativement moins nombreux (15 % et 19 %), et se rapprochent de ceux obtenus dans le cas où la GFP est transfectée seule (18 %). Cette faible proportion de faisceaux dans le contrôle peut provenir de microtubules qui se chevauchent sans être liés les uns aux autres, par exemple au niveau des repliements à la périphérie des cellules, mais que le masque détecte comme étant des faisceaux. Ces résultats sont donc comparables à ceux obtenus *in vitro*, excepté pour la Δ N-tau qui ne semble pas former plus de faisceaux que la 4R-tau. Cela peut venir de la surexpression de 4R-tau qui compenserait l'effet inhibiteur de son domaine de projection. Par ailleurs, il faudrait peut-être refaire cette étude en analysant pour chaque cellule le taux de transfection et en rapportant la quantité de faisceaux à cette valeur. Ici, nous n'avons pas tenu compte de l'intensité de fluorescence émise par tau.

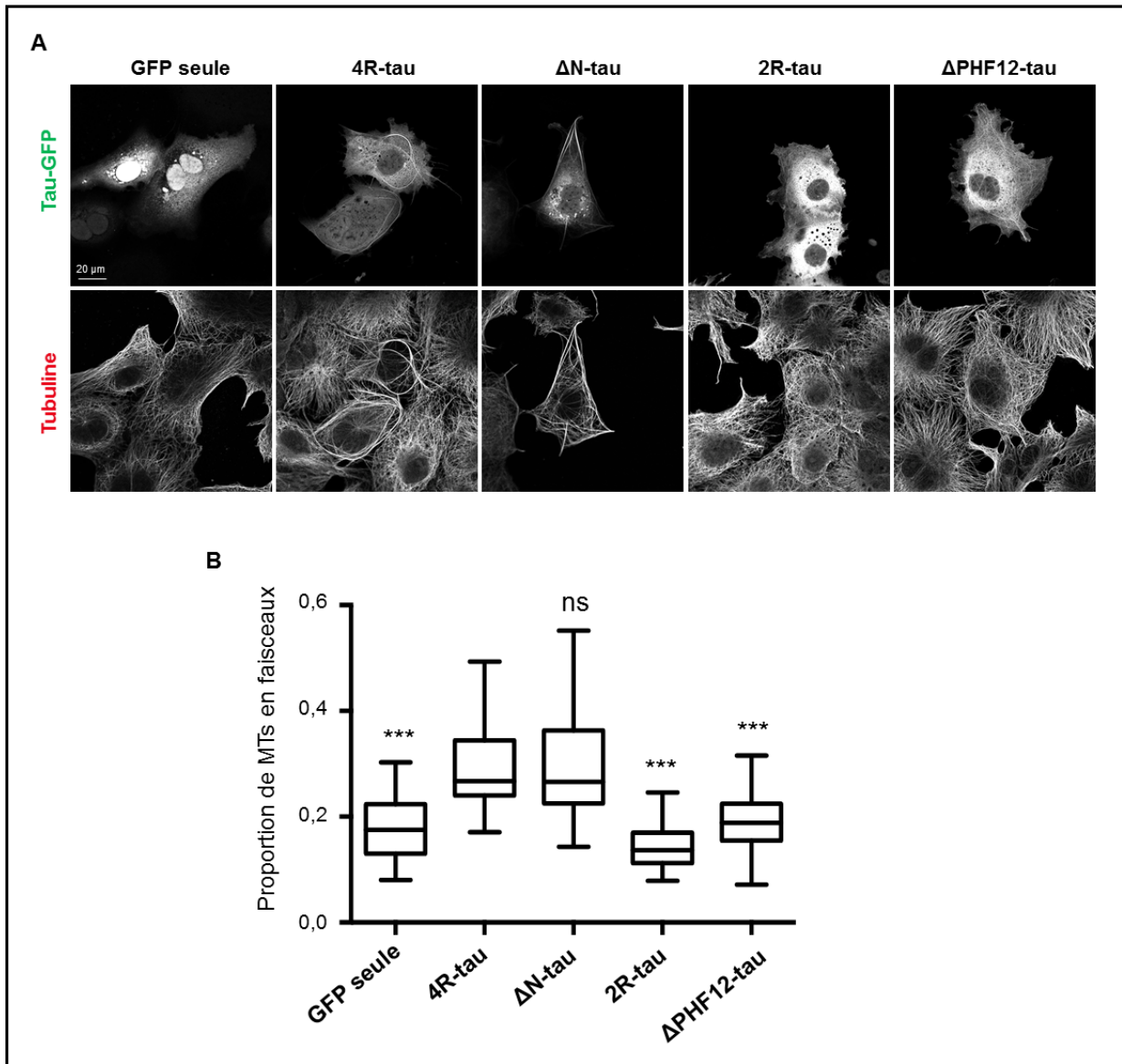


Figure 40. Effet de différentes constructions de tau sur les faisceaux de microtubules dans les cellules COS-7. (A) Images obtenues au confocal à l'objectif 63X. La protéine tau surexprimée est révélée avec un anticorps anti-GFP couplé à un anticorps secondaire-Alexa488 et la tubuline endogène est révélée avec un anticorps anti-tubuline couplé à un anticorps secondaire-Alexa565. (B) Quantification de la proportion de faisceaux de microtubules par rapport à la quantité totale des microtubules par cellule. Les boîtes à moustache représentent la médiane des valeurs avec les valeurs minimales et maximales ($n > 30$ cellules). La diminution de la quantité de faisceaux dans les cellules transfectées avec les différentes constructions de tau est significative par rapport à la 4R-tau pour toutes les constructions sauf pour la Δ N-tau (test One-Way Anova non paramétrique (Kruskal-Wallis)).

Chapitre III : Résultats (2)
Organisation des cytosquelettes de
microtubule et d'actine par tau

Résumé de l'article

La coopération entre les microtubules et les filaments d'actine dans les neurones est nécessaire à leur différenciation ainsi qu'à l'activité et la plasticité des synapses. Cependant, les mécanismes qui régissent cette coordination, et particulièrement les protéines capables d'établir un lien entre les deux polymères, restent très mal identifiés. Nous nous sommes demandé si la MAP neuronale tau, initialement caractérisée pour sa capacité à promouvoir l'assemblage des microtubules et à les stabiliser, pourrait constituer un acteur direct de l'interaction entre les microtubules et les filaments d'actine. En effet, l'interaction de tau avec l'actine a été proposée depuis quelques années mais a été longtemps controversée.

Dans un premier temps, nous avons montré en système reconstitué à partir de protéines purifiées que tau interagit directement avec les filaments d'actine et qu'elle les organise en faisceaux. Tau est également capable de lier simultanément des filaments d'actine et des microtubules pré-polymérisés et stabilisés, et d'induire des faisceaux mixtes de ces deux polymères. Grâce à la mise au point d'un système original permettant l'observation en temps réel par microscopie TIRF de l'assemblage concomitant de tubuline et d'actine, j'ai pu étudier *in vitro* la co-organisation des deux cytosquelettes par tau. Les résultats montrent que tau induit une croissance couplée des microtubules et des filaments d'actine caractérisée par différents types d'évènements : polymérisation et redressement des filaments d'actine le long des microtubules, croissance et déformation éventuelle des microtubules le long de câbles d'actine. Ces phénomènes conduisent à un co-alignement global des réseaux de microtubules et d'actine contraignant leur polymérisation suivant la même direction. De plus, le comportement dynamique de chacun des polymères ne semble pas affecté lorsqu'ils se co-alignent (leur vitesse de polymérisation reste la même).

Afin de déterminer les domaines de tau responsables de l'interaction microtubules/actine, j'ai produit différentes constructions de tau avec 1/ un nombre variable (0, 1, 2 ou 3) de motifs répétés constituant le domaine de liaison aux microtubules (MTBD) (probablement impliqué dans l'interaction avec l'actine) et 2/ une délétion de la partie N-terminale (domaine potentiel de dimérisation de tau). L'analyse de l'effet de ces mutants sur le couplage microtubules/actine nous a permis de conclure que l'interaction des microtubules et de l'actine nécessitait la présence d'au moins deux des quatre motifs répétés du MTBD de tau. Nous en avons déduit un modèle selon lequel tau coordonnerait les microtubules et l'actine en répartissant ses domaines répétés entre les deux cytosquelettes. En parallèle, j'ai

participé à une étude montrant l'interaction directe de tau avec l'actine et une triple co-localisation tau/microtubules/actine dans des neurones en développement (données présentées en partie complémentaire de l'article).

Par ailleurs, j'ai été impliquée dans une étude en collaboration avec l'équipe d'Alain Buisson, montrant la localisation de la protéine tau dans les synapses de neurones activés où elle modulerait le cytosquelette d'actine (article en annexe). L'ensemble de ces résultats montrent que tau établit un lien physique entre les microtubules et les filaments d'actine, qui pourrait entrer en jeu lors de la co-organisation des deux cytosquelettes nécessaire à la croissance des neurites lors de la différenciation des neurones ou pendant leur activité synaptique.

SCIENTIFIC REPORTS

OPEN

Tau co-organizes dynamic microtubule and actin networks

Auréliane Elie^{1,2}, Elea Prezel^{1,2}, Christophe Guérin³, Eric Denarier^{1,2,4}, Sacnicté Ramirez-Rios^{1,2}, Laurence Serre^{1,2}, Annie Andrieux^{1,2,4}, Anne Fourest-Lieuvin^{1,2,4}, Laurent Blanchoin³ & Isabelle Arnal^{1,2}

Received: 05 December 2014

Accepted: 25 March 2015

Published: 05 May 2015

The crosstalk between microtubules and actin is essential for cellular functions. However, mechanisms underlying the microtubule-actin organization by cross-linkers remain largely unexplored. Here, we report that tau, a neuronal microtubule-associated protein, binds to microtubules and actin simultaneously, promoting *in vitro* co-organization and coupled growth of both networks. By developing an original assay to visualize concomitant microtubule and actin assembly, we show that tau can induce guided polymerization of actin filaments along microtubule tracks and growth of single microtubules along actin filament bundles. Importantly, tau mediates microtubule-actin co-alignment without changing polymer growth properties. Mutagenesis studies further reveal that at least two of the four tau repeated motifs, primarily identified as tubulin-binding sites, are required to connect microtubules and actin. Tau thus represents a molecular linker between microtubule and actin networks, enabling a coordination of the two cytoskeletons that might be essential in various neuronal contexts.

A tight coordination between microtubules and actin is required for many cellular functions, such as cell division, migration and morphogenesis¹. In neurons, this synergistic activity drives the guided extension of axons during neuronal development, as well as the formation and activity of synapses in mature neurons^{2,3}. Microtubule/actin interactions involved in these processes include various events like the co-alignment and coordinated assembly of both polymers^{1,4–6}. To date, several candidates have been identified as linkers between the two cytoskeletal systems; however the molecular mechanisms governing this crosstalk are still poorly explored^{1,3}.

Tau is a neuronal microtubule-associated protein that promotes microtubule polymerization and bundling^{7–11}, and is responsible for microtubule stabilization in axons^{12,13}. Tau is involved in the development and maintenance of the nervous system and the deregulation of its function is associated with Alzheimer's disease and other neurodegenerative pathologies^{14,15}. Beyond its microtubule-stabilizing properties, tau is also implicated in the regulation of actin cytoskeleton¹⁶. Accordingly, several *in vitro* studies have reported the association with actin of the full-length tau^{17,18} and tau sub-regions containing the microtubule-binding sites^{19,20}, although this direct interaction has been controverted²¹. *In vivo*, tau co-localizes with actin in differentiating PC12 cells²² and in the post-synaptic compartments of mature neurons²³. Tau has also been found on dynamic microtubules in the actin-rich growth cone areas of developing neurons^{24,25}. Furthermore, tau neurotoxicity correlates with alterations of actin organization in animal models of Alzheimer's disease¹⁷. Overall, these data support a role for tau as a regulator of microtubules and actin, and suggest that tau is a potential linker between the two cytoskeletons as hypothesized some years ago¹. In the present study, we investigated the ability of tau to simultaneously interact with actin and tubulin. Using reconstituted cell-free systems, we addressed the basic mechanisms underlying tau-mediated co-organization of dynamic microtubule and actin networks.

¹Inserm, U836, BP170, 38042 Grenoble, Cedex 9, France. ²Université Grenoble Alpes, Grenoble Institut des Neurosciences, BP170, 38042 Grenoble, Cedex 9, France. ³Institut de Recherches en Technologies et Sciences pour le Vivant, iRTSV, Laboratoire de Physiologie Cellulaire et Végétale, CNRS/CEA/INRA/UJF, 38054 Grenoble, France. ⁴iRTSV, GPC, CEA, 38054 Grenoble, France. Correspondence and requests for materials should be addressed to I.A. (email: isabelle.arnal@ujf-grenoble.fr)

Results

Tau simultaneously binds to microtubules and actin filaments. Tau can be divided into two large domains: an N-terminal portion, called the projection domain, and a C-terminal part containing three or four repeats of a conserved 31–32 amino-acid stretch (Fig. 1a). These repeat motifs are required for the microtubule-binding and -stabilizing properties of tau^{11,26,27}, and have also been proposed to interact with actin^{18–20}. In addition, the regions flanking the repeats (i.e. the proline-rich domain and/or the C-terminal sequence of tau) are implicated in tau interaction with each polymer^{11,18,28}. To study the role of tau in the microtubule/actin interplay, we produced recombinant human tau containing four microtubule-binding sites (4R-tau), which interacted with microtubules (Fig. 1b) and promoted both their assembly and bundling as expected (Supplementary Fig. S1a and b)^{7–11}. We tested the effect of tau on *in vitro* actin assembly and organization. Our results showed that tau bound to actin filaments (F-actin) with an apparent equilibrium dissociation constant ($K_{d,app}$) of about 241 ± 43 nM (Fig. 1c), a value close to $K_{d,app}$ of tau for microtubules measured by a similar experimental approach (280 ± 52 nM, Fig. 1b). The $K_{d,app}$ value of tau for F-actin was similar in the buffers used either for actin assembly (Fig. 1c) or actin/tubulin co-assembly (Supplementary Fig. S1c). We found that tau did not significantly affect actin assembly properties by using pyrene-actin polymerization and F-actin sedimentation (Supplementary Fig. S1d and e). In contrast, tau influenced actin organization by promoting the apparition of bundled F-actin in a concentration dependent manner, as revealed by light scattering (Fig. 1d) and low-speed sedimentation assays (Fig. 1e, see also Supplementary Fig. S1f). We next visualized, for the first time in real time, the effect of tau on actin organization by Total Internal Reflection Fluorescence (TIRF) microscopy (Fig. 1f, Supplementary Movie S1). In the absence of tau, only single actin filaments could be observed whereas, in the presence of tau, they progressively formed long and thick F-actin bundles. Quantification of actin growth rate at early time points indicated that tau did not significantly changed the elongation speed of actin compared to the control (1.78 ± 0.28 and 1.76 ± 0.41 $\mu\text{m}/\text{min}$, respectively). Overall, our data indicate that tau is an actin-binding and -bundling protein in agreement with previous studies showing the direct interaction of the full-length tau with actin filaments^{17,18}. These results are consistent with an actin-scaffolding role for tau that has been recently proposed to regulate the morphological changes underlying synaptic plasticity in mature neurons²³.

The ability of tau to interact with F-actin raises the possibility that tau operates as a cross-linker between microtubules and actin filaments. To investigate this hypothesis, we set up sedimentation conditions to assay tau interaction with pre-polymerized microtubules and actin filaments. Tau was added to taxol-stabilized microtubules and/or phalloidin-stabilized F-actin, and reactions were centrifuged at very low speed on a sucrose cushion (Fig. 1g). In these conditions, microtubules bundled by tau were pelleted, while all other polymers, i.e. single microtubules, single F-actin and tau-induced bundled F-actin, remained in the supernatant (Fig. 1g, left panel). In contrast, F-actin sedimented only when incubated with microtubules and tau (Fig. 1g, right panel), suggesting that tau simultaneously interacts with both cytoskeletons and promotes the formation of large macro-molecular complexes. We next visualized fluorescently-labelled pre-polymerized microtubules and actin filaments with or without tau (Fig. 1h). In the absence of tau, single microtubules and F-actin were randomly distributed in the solution (Fig. 1h, left), whereas hybrid bundles of co-aligned microtubules and actin filaments appeared in the presence of tau (Fig. 1h, right). Using co-sedimentation assays onto coverslips in conditions where F-actin did not sediment unless associated with single or bundled microtubules, we observed mixed arrays of microtubules and F-actin only in the presence of tau (Fig. 1i). This result supports the idea that tau tightly connects the two cytoskeletons.

Tau coordinates dynamic microtubules and actin filaments. We next wondered whether tau was able to co-organize microtubules and actin filaments while assembling. For this purpose, we reconstituted a minimal and original system, in which concomitant self-polymerization of both tubulin and actin could be followed by live TIRF microscopy. To our knowledge, this is the first *in vitro* assay allowing the visualization of dynamic tubulin and actin polymers simultaneously. Microtubules and actin filaments were elongated from a mixture of actin monomers (0.4 μM) and tubulin dimers (20 μM) containing small fractions of fluorescently-labelled actin monomers and tubulin dimers. In the absence of tau, single microtubules and actin filaments assembled independently without any significant contact (Fig. 2a, Supplementary Movie S2). Addition of fascin, a specific actin-bundler²⁹, induced cross-linking of actin filaments, but neither affected microtubule organization nor promoted microtubule/actin interactions (Fig. 2a, Supplementary Movie S2). In contrast to fascin, tau was able to coordinate microtubule and actin networks by progressively co-aligning growing microtubules and growing actin filaments (Fig. 2a–e, Supplementary Movie S3). Coupling of microtubule and actin assembly in the presence of tau was mostly characterized by the following events: guided polymerization of single or bundled actin filaments along single or bundled microtubule tracks (Fig. 2a,b, Supplementary Movies S3 and S4a) and progressive straightening of curved F-actin by the end of elongating microtubules (Fig. 2c, Supplementary Movie S4b). Accordingly, the curvature of actin filaments significantly decreased compared to that of actin filaments co-polymerized with tubulin and fascin, illustrating the microtubule-dependent deformation of F-actin in the presence of tau (Fig. 2f). We also observed the growth of single microtubules along F-actin cables (Fig. 2c–e, Supplementary Movie S4c) and, in some cases, thick actin filament bundles could shape and deform microtubules elongating along their tracks (Fig. 2d,e, arrowheads, and Supplementary Movie

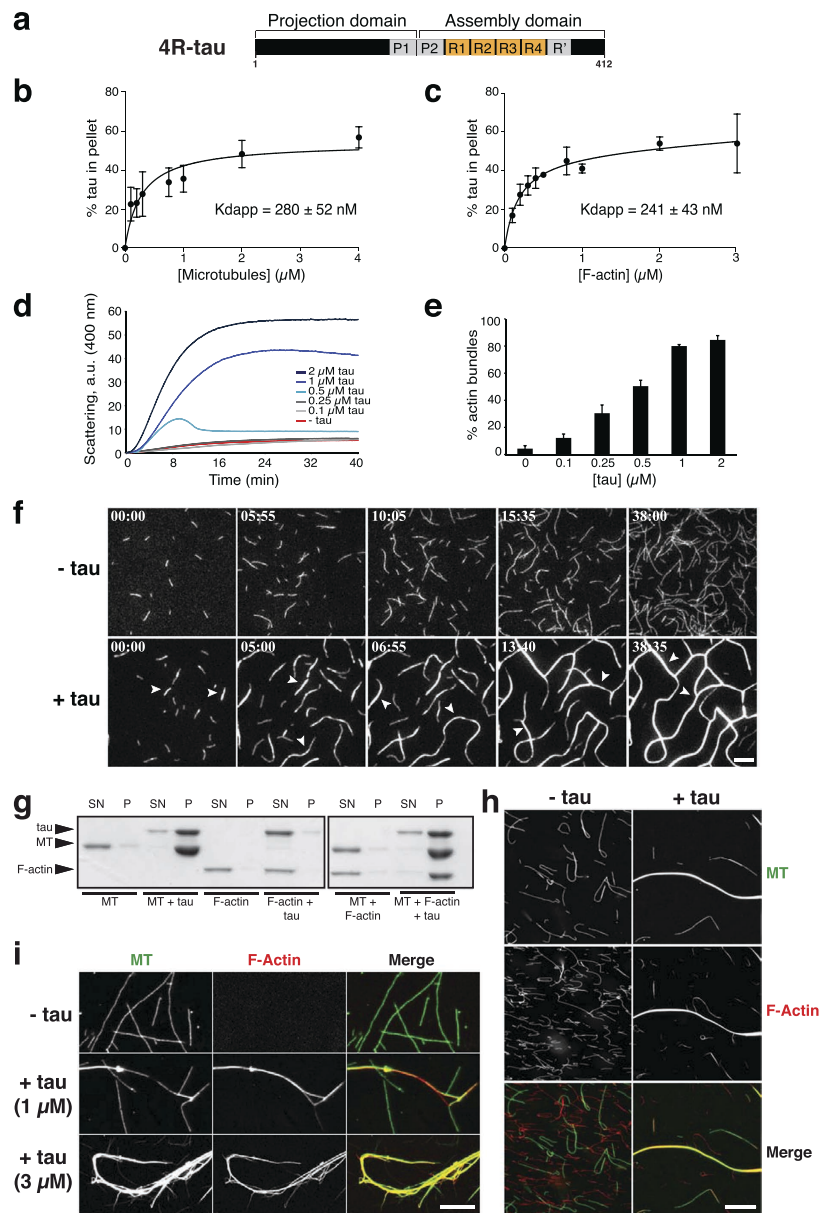


Figure 1. Tau interacts with microtubules and F-actin, and forms hybrid bundles of both polymers. (a) Scheme of tau isoform used in this study. Tau projection domain contains a proline-rich region (P1). The C-terminal domain consists of a proline-rich region (P2), 4 repeat motifs (R1–R4) and a C-terminal extension comprising a pseudo-repeat motif (R'). (b) Tau binding affinity for microtubules. Increasing concentrations of microtubules were incubated with 0.5 μM tau in BRB80-K buffer. Percentage of bound tau was plotted against microtubule concentration and fitted with a hyperbolic function. The K_{dapp} value was 280 ± 52 nM (mean $\pm$ SD, five independent experiments). (c) Tau binding affinity for F-actin. Increasing concentrations of F-actin were incubated with 0.5 μM tau in AP buffer. Percentage of bound tau was plotted against F-actin concentration and fitted with a hyperbolic function. The K_{dapp} value was 241 ± 43 nM (mean $\pm$ SD, three independent experiments). (d) Time course of actin bundling (4 μM) with increasing tau concentrations, monitored by light scattering at 400 nm. a.u., arbitrary units. (e) Quantification of actin bundles by low speed sedimentation after 1 hour incubation with various tau concentrations. Data represent the mean $\pm$ SD (three independent experiments). (f) TIRF microscopy of actin (0.4 μM) polymerized with or without 0.4 μM tau. Time 00:00 (min:sec) indicates start of acquisition. Arrowheads, F-actin bundles; scale bar, 10 μm . (g) Tau induces microtubules/F-actin complexes. Tau (4 μM) was mixed with either 2 μM taxol-stabilized microtubules, 2 μM phalloidin-stabilized F-actin or both polymers before low-speed centrifugation. F-actin sedimented only with microtubules and tau. P, pellet; SN, supernatant; MT, microtubule. (h, i) Visualization of tau-induced complexes between phalloidin-stabilized F-actin (red) and taxol-stabilized microtubules (green). (h) Microtubules (0.3 μM) and F-actin (0.2 μM) were mixed for 30 minutes with or without tau (0.5 μM) before fixation and observation. Scale bar, 10 μm . (i) Microtubules (2 μM) and F-actin (4 μM) were incubated with increasing concentrations of tau before centrifugation at 50,000xg to sediment single/bundled microtubules but not F-actin alone. Scale bar, 10 μm .

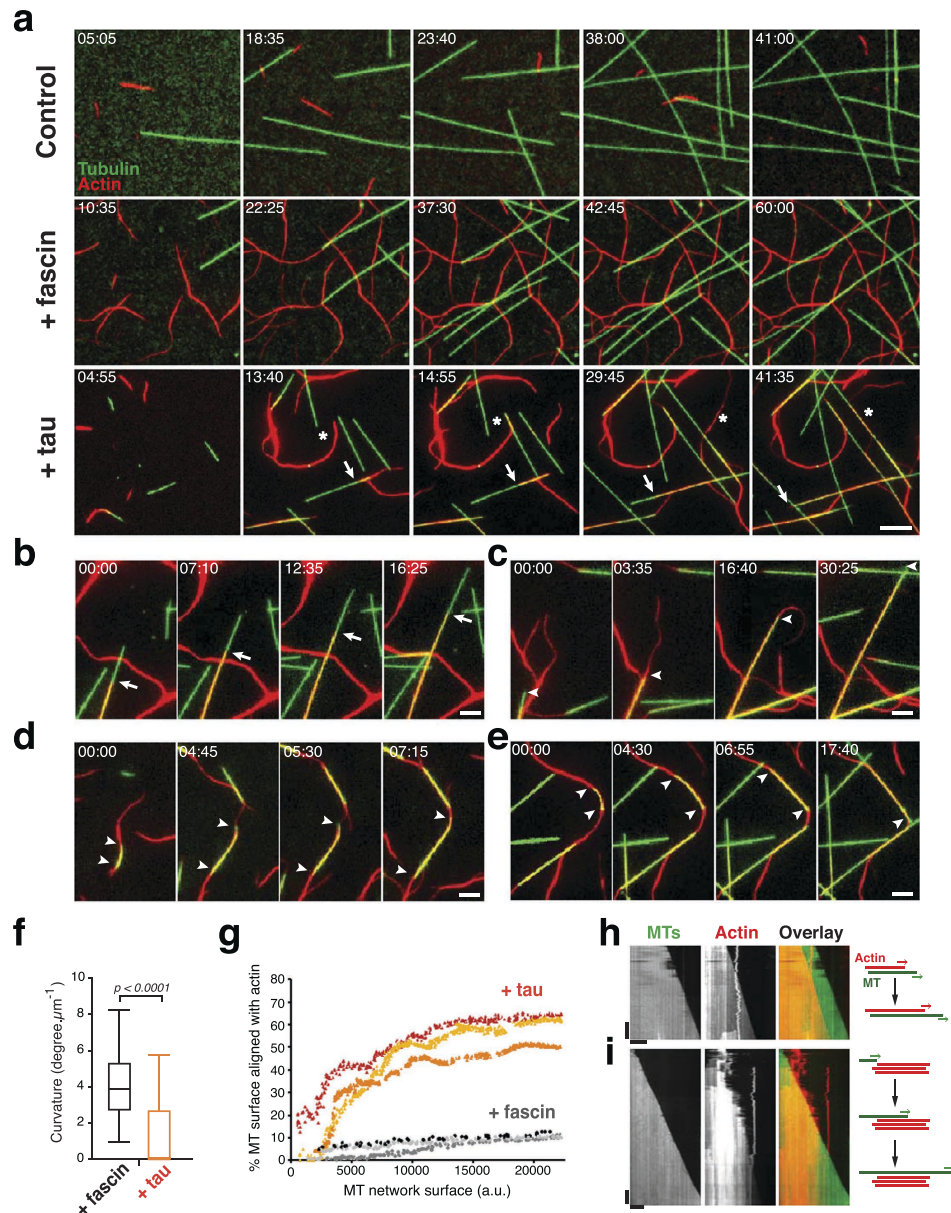


Figure 2. Tau coordinates dynamic microtubules and actin filaments. (a) TIRF microscopy of co-polymerizing microtubules and F-actin. In the control (upper panel), 20 μM tubulin dimers (green) were co-assembled with 0.4 μM actin monomers (red). Most actin filaments were floating out of the TIRF field due to a lower medium viscosity compared to conditions used for actin assembly (see Methods). Addition of 1 μM fascin (middle panel) induces the apparition of a network of F-actin bundles randomly distributed around microtubules. Tau at 0.7 μM (lower panel) co-organizes growing microtubules and F-actin. In this last condition, we decreased tubulin concentration to 5 μM to avoid extensive microtubule self-assembly induced by tau. White stars show zippering events between microtubules and actin filaments, arrows point actin filaments growing along microtubules. Time 00:00 (min:sec) indicates start of acquisition. Scale bar, 10 μm . (b–e) Detailed views of typical microtubule/actin coupling events observed in the presence of tau: guided growth of F-actin along the microtubule wall (b), straightening of curved actin filaments by a growing extremity of a microtubule (c) and single microtubules elongating along actin bundles (d, e). White arrows and arrowheads indicate extremities of growing F-actin and microtubules, respectively. Time 00:00 (min:sec) indicates start of event. Scale bar, 5 μm . (f) Curvature of actin filaments co-assembled with tubulin and either fascin or tau. Boxes and whiskers represent 25–75 and 5–95 percentiles, respectively and lines within boxes indicate median values (3.89 and 0.094 $\text{degree}\cdot\mu\text{m}^{-1}$ with fascin and tau, respectively). Data were compared using the Mann-Whitney test ($n=346$ and 354 actin filaments for fascin and tau, respectively). Quantification was performed on fixed time-point images displaying similar microtubule densities. (g) Percentage of microtubule surface co-aligned with F-actin as a function of microtubule network surface in the presence of tau or fascin (three representative curves). a.u., arbitrary units. (h, i) Kymographs of co-aligned growing microtubules and F-actin in the presence of tau. Schemes of microtubule/actin co-organization are drawn on the right. Horizontal bars, 10 μm ; vertical bars, 3 min.

S4c). We next quantified the microtubule/actin crosslinking activity of tau by measuring the percentage of microtubules co-aligned with actin filaments. Results indicate that the proportion of the microtubule network associated with F-actin increases up to 60% as a function of the total microtubule surface, whereas it did not exceed 14% in the presence of fascin (Fig. 2g).

We then asked whether the physical association of microtubules and actin filaments induced by tau affected their own assembly properties. Fig. 2h,i show representative kymographs of co-aligned microtubules and actin filaments: a single actin filament growing along a single microtubule (Fig. 2h) and a microtubule encountering bundled F-actin (Fig. 2i). Measurements of growth rates indicated that the microtubule speed ($1.28 \pm 0.17 \mu\text{m}/\text{min}$, $n=52$) did not change when microtubule-growing ends encountered actin filaments and co-aligned ($1.31 \pm 0.16 \mu\text{m}/\text{min}$, $n=41$). The elongation rate of F-actin polymerizing along microtubule tracks ($1.21 \pm 0.16 \mu\text{m}/\text{min}$, $n=80$) was also very similar to the one measured for isolated actin filaments ($1.29 \pm 0.29 \mu\text{m}/\text{min}$, $n=35$). Thus, the tight association and coupled growth of microtubules and F-actin did not modify the intrinsic assembly properties of each polymer. Overall, our results reveal that tau promotes the co-alignment of microtubules and actin filaments, which allows the two networks to adopt the same global organization and direction of growth.

Tau bridges microtubules and actin *via* its tubulin-binding sites. To evaluate which sub-regions of tau serve as bridges between microtubules and F-actin, we generated tau mutants deleted from either the N-terminal projection domain or various numbers of repeats (Fig. 3a and Supplementary Fig. S2a). Indeed, the projection domain might regulate microtubule spacing within bundles possibly *via* homodimerization^{9,30}, a mechanism that could be critical for bridging microtubules and F-actin. To test this hypothesis, we studied the effect of the N-terminal deleted form of tau ($\Delta\text{N-tau}$) on microtubule and actin co-organization. Our results show that $\Delta\text{N-tau}$ binds to F-actin and to microtubules independently (Supplementary Fig. S2b and c), and cross-links both polymers in growing conditions similarly to the full-length tau (Fig. 3b, Supplementary Movie S5). This suggests that the C-terminal part of tau is sufficient to establish a physical link between microtubules and actin filaments and that tau dimerization through its N-terminal part is unlikely involved in this process. We next produced mutants lacking one to four repeats (3R-, 2R-, 1R- and 0R-tau, Fig. 3a) and examined their ability to co-align dynamic microtubules and actin filaments by TIRF microscopy (Fig. 3c, Supplementary Movie S6). Since the activity of tau to promote microtubule self-assembly decreases with the number of repeat motifs¹¹, the concentrations of tau proteins and tubulin were adjusted to ensure that actin polymerization, which was not influenced by tau, and tubulin polymerization started almost simultaneously (Supplementary Movie S6, see also Methods). The different deleted forms of tau still associated independently with microtubules and F-actin in similar concentration ratios of tubulin:tau and actin:tau used for the TIRF assay (Supplementary Fig. S2b and c). To evaluate the influence of tau repeats on microtubule/actin coupling, we measured for each tau mutant the proportion of the microtubule surface co-localizing with F-actin at similar microtubule densities (Fig. 3b,c, bottom panel, Supplementary Movie S6). In the presence of tau proteins with 2, 3 and 4 repeats, about 50% of the microtubule network co-aligned with actin filaments. In contrast, the deletion of more than two repeats (1R- and 0R-tau) almost abolished the link between the two cytoskeletal arrays (Fig. 3b,c). In these conditions, the percentage of the microtubule surface associated with actin filaments strongly decreased to values comparable to those obtained with fascin (Fig. 3b). These data indicate that the repeat motifs are crucial for the microtubule/actin cross-linking activity of tau. Our results suggest a mechanism whereby a minimum of two tau repeats are required to bridge polymers, with one repeat bound to microtubules and the other one to actin filaments (Fig. 4).

Discussion

In neurons, several molecules have been identified as key players in the microtubule/actin crosstalk, including proteins that simultaneously bind to microtubules and F-actin (e.g. members of the spectraplakins family^{31,32}) or multi-component complexes of microtubule- and actin-binding factors (e.g. the microtubule end-binding protein EB3 and the actin-binding protein drebrin³³). The interaction of tau with microtubules in neurons is well documented and more recent studies have proposed that tau also binds to actin³⁴. Our work demonstrates that tau acts as a molecular linker between microtubules and actin filaments, enabling the *in vitro* co-organization and coupled growth of the two networks (Fig. 4). These data provide the first evidence for a direct role of tau in the dynamic coordination of microtubule and actin cytoskeletons. We propose a mechanism in which the repeat motifs of tau establish a structural connection between microtubules and actin filaments through the distribution of repeats between the two polymers (Fig. 4). Several phosphorylation sites within the repeats and adjacent sequences have been shown to finely regulate the microtubule-binding and -stabilizing properties of tau^{11,28,35}. Whether and how these phosphorylation sites modulate the affinity of tau for F-actin, and possibly its microtubule/actin cross-linking activity, remain to be elucidated. Interestingly, a recent *in vitro* study has reported the alignment of microtubules along pre-existing actin arrays *via* the cross-linking activity of plus-end tracking proteins at the growing extremity of microtubules³⁶, highlighting that the microtubule/actin cross-talk involves different mechanisms based on both lattice and end-binding factors.

The intrinsic capacity of tau to connect the two cytoskeletal systems suggests that it might be at play in the global cytoskeleton reorganization during neuronal development. Tau could contribute to the co-alignment and tandem polymerization of microtubules and actin filaments, the guided growth

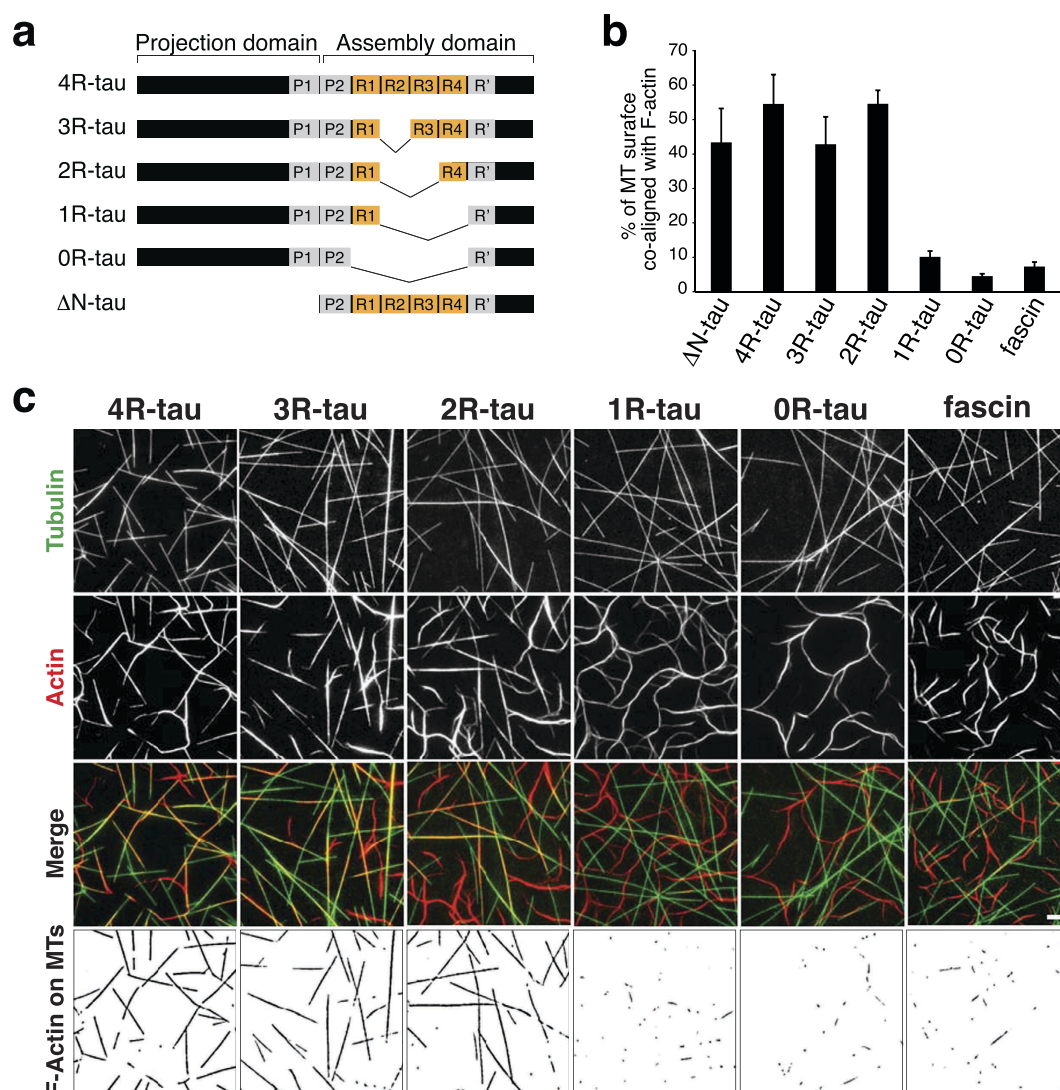


Figure 3. Tau microtubule-binding sites are required for microtubule/actin crosslinking. (a) Schematic representation of the different tau constructs used in this study. (b and c) Microtubule/F-actin cross-linking activity of tau proteins. Microtubules and F-actin were co-assembled from tubulin dimers and actin monomers in the presence of the various tau proteins and analyzed by TIRF microscopy (see Methods for details). (b) Quantification of the percentage of microtubule surface co-localizing with F-actin from TIRF images at fixed time points exhibiting similar microtubule densities (see examples in (c)). Fascin that does not bind to microtubules serves as a negative control. For statistical analysis, we used a non-parametric Kruskal-Wallis ANOVA test followed by post-hoc Dunn comparisons. P values calculated in comparison to the 4R-tau conditions are 0.0626 (1R-tau), 0.0009 (0R-tau) and 0.0286 (Fascin). Error bars represent standard deviations (three to six independent experiments). (c) Examples of fixed time point images used to quantify the percentage of microtubule surface co-aligned with F-actin in various conditions. Images were taken at similar microtubule densities. The masked images (lower panel) represent the microtubule area that co-localizes with actin. Scale bar, 10 μ m.

of microtubules along actin cables, or the microtubule-dependent actin reorganization that have been described in the growth cone of elongating axons and at axon branching points^{1,4-6}. Along this line, several studies have reported a role for tau in neurite outgrowth, although details about the implication of tau in axonal guidance are unclear^{25,37-39}. Furthermore, tau has been recently found in the synaptic compartment of mature neurons^{23,40} where it may participate to the microtubule/actin coordination that control synapse morphology and functions^{2,41,42}.

Overall, our work advances our understanding of tau's cytoskeleton-regulating properties and provides new insights into the basic mechanisms that govern the coordination between microtubule and actin cytoskeletons. Given the role of tau in Alzheimer's disease and related tauopathies, it is essential to

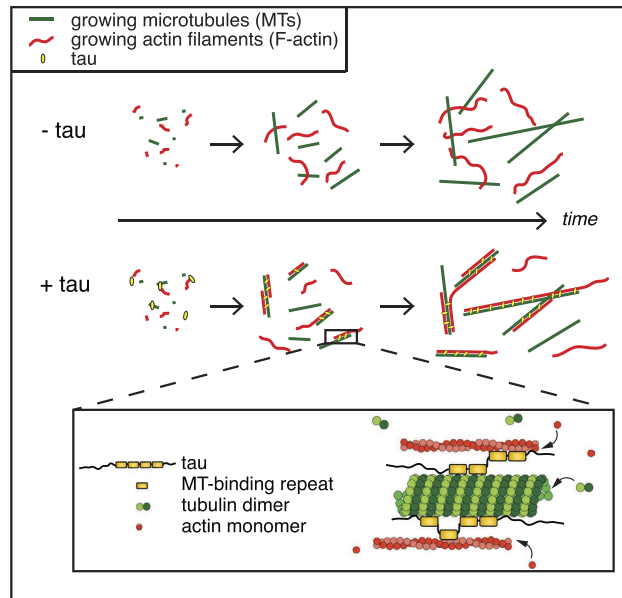


Figure 4. Model for tau-mediated coordination of microtubule and actin cytoskeletons. Tau promotes the co-alignment and coupled growth of microtubules (green) and actin filaments (red). We suggest that one tau molecule would bind both actin and microtubules simultaneously and that the distribution of tubulin-binding repeated sites of tau would be required to establish the structural link between the two cytoskeletal polymers (inset). At least two repeats are necessary for the crosslinking activity of tau, with one repeat interacting with microtubules and the other one with actin filaments.

elucidate how tau interacts with microtubules and actin in order to decipher molecular pathways leading to cytoskeleton alterations in these pathologies.

Methods

DNA constructs and reagents. We used tau isoforms containing three or four repeats (R) at their C-terminus and one N insert at their N-terminus (1N3R- and 1N4R-tau, respectively named 3R- and 4R-tau in the present study). The cDNA of these two isoforms subcloned in the pDEST17 vector were kindly provided by Dr. N. Sergeant (Lille, France). The following tau constructs were generated by a PCR-based strategy (amino-acid numbers are given according to the longest 2N4R-tau isoform): Δ N-tau corresponding to amino acids S198-L441 and repeat-deleted constructs 2R-tau, 1R-tau, 0R-tau in which V275-Q336, V275-K369 and Q244-K369 domains were deleted respectively. When not stated, reagents were from Sigma.

Protein purification. His-tagged recombinant tau proteins were purified using Talon metal affinity resin (Clontech) and processed by size exclusion in BRB80 buffer (80 mM Pipes, 1 mM EGTA, 1 mM MgCl_2 , pH 6.8). Human fascin and profilin were purified as described^{43,44}. Tubulin was purified from bovine brain and labelled with ATTO-488⁴⁵ (ATTO-TEC GmbH, Germany). Actin was purified from rabbit skeletal muscle and labelled with Alexa-568 or pyrene⁴³.

Tau interaction with microtubules or F-actin. Taxol-stabilized microtubules were prepared by polymerizing 70 μM tubulin at 36 °C in BRB80 buffer with 1 mM GTP. After 60 min, 70 μM taxol was added and microtubules further incubated 30 min at 36 °C, before being centrifuged for 5 min at 230,000 $\times g$ and resuspended in BRB80 buffer. 4R-tau (0.5 μM) was incubated with increasing concentrations of taxol-stabilized microtubules for 30 min at room temperature (RT) in BRB80 buffer supplemented with 50 mM KCl (BRB80-K). Samples were centrifuged for 15 min at 230,000 $\times g$ and analysed by SDS-PAGE. The amount of 4R-tau bound to microtubules in the pellets was quantified by densitometry on Coomassie-stained gels using Image J software (version 1.49g, NIH, USA). The percentage of bound 4R-tau was plotted versus microtubule concentrations and the apparent equilibrium dissociation constant was calculated from a fitted hyperbolic curve using Prism 6 (GraphPad software, USA). In the absence of microtubules, no tau was detected in the pellet indicating that tau was soluble under these conditions. To determine tau affinity for F-actin, phalloidin-stabilized F-actin was prepared from 20 μM G-actin incubated for 1 h at RT with 20 μM phalloidin in AP (Actin Polymerization) buffer containing 2 mM Tris pH 8.0, 0.2 mM ATP, 0.5 mM DTT, 0.1 mM CaCl_2 , 50 mM KCl, 1 mM MgCl_2 , 1 mM EGTA, 10 mM imidazole. Increasing amounts of phalloidin-stabilized F-actin were incubated with 0.5 μM 4R-tau in AP

buffer for 30 min at RT. Samples were centrifuged at 100,000 $\times$ g for 15 min and the amount of 4R-tau bound to F-actin in the pellets was quantified as described above. Mean values of dissociation constants were calculated from the average of at least three independent experiments. In the absence of actin, no tau was detected in the pellet.

Actin bundling assays. Increasing amounts of 4R-tau were added to 4 μ M G-actin and the formation of F-actin bundles was monitored by light scattering at 400 nm. The amount of bundles was quantified after 1 hour incubation by sedimentation as described above with a centrifugation speed of 15,000 $\times$ g for 10 min to selectively pellet bundled F-actin.

Cross-linking activity of tau on pre-formed microtubules and F-actin. Various combinations of taxol-stabilized microtubules (2 μ M), phalloidin-stabilized F-actin (2 μ M) and 4R-tau (4 μ M) were incubated in BRB80 buffer for 30 min at RT and centrifuged on a 30% sucrose cushion for 10 min at 4,000 $\times$ g. Supernatants and pellets were analyzed by SDS-PAGE. To visualize microtubule/F-actin complexes, fluorescent taxol-stabilized microtubules were prepared from tubulin containing 10% of fluorescent ATTO-565 tubulin. Fluorescent taxol-stabilized microtubules (0.3 μ M) and fluorescent ATTO-488 phalloidin-stabilized F-actin (0.2 μ M) were incubated for 30 min at RT in BRB80 buffer with or without 4R-tau (0.5 μ M) and examined under the fluorescence microscope (Zeiss Axioskop). For sedimentation onto coverslips, fluorescent taxol-stabilized microtubules (1 μ M), fluorescent phalloidin-stabilized F-actin (2 μ M) and increasing amounts of 4R-tau were incubated in BRB80 buffer at RT for 40 min (sample volume of 20 μ l). Reactions were stopped by addition of 1 ml of BRB80 buffer containing 0.5% glutaraldehyde and 25% (w/v) sucrose. Samples were loaded onto 7 ml of 10% glycerol cushion, centrifuged onto coverslips for 30 min at 50,000 $\times$ g, fixed in methanol and observed under the fluorescence microscope.

TIRF microscopy. Perfusion chambers were prepared with functionalized silane-PEG (Creative PEGwork) glass slides, as described previously⁴⁶. For actin polymerization, the flow cell was incubated with PLL-g-PEG (2 kDa, 0.1 mg/mL in 10 mM Hepes, pH 7.4, Jenkem) and washed with 1% BSA in AP-buffer. Actin growth was initiated by flowing 0.4 μ M G-actin (containing 30% Alexa-468 labelled G-actin) together with 0.1 μ M 4R-tau in AP-buffer containing 0.2 mM ATP, 0.3 μ M profilin, 4 mM DTT, 1% BSA, 1 mg/ml glucose, 70 μ g/ml catalase, 580 μ g/ml glucose oxidase and 0.3% methylcellulose. For actin and tubulin co-assembly, the flow cell was incubated with PLL-g-PEG, then washed with 1% BSA in BRB80 buffer. Microtubule and actin growth was initiated by flowing tubulin dimers (containing 30% ATTO-488 labelled tubulin) and G-actin (containing 30% Alexa-568 G-actin) in the absence or in the presence of tau proteins in BRB80-K buffer containing 1 mM GTP, 4 mM DTT, 1% BSA, 0.4 μ M profilin, 1 mg/ml glucose, 70 μ g/ml catalase, 580 μ g/ml glucose oxidase and 0.2% methylcellulose. These specific buffer conditions allowed simultaneous polymerization of actin and tubulin with a similar nucleation lag time, in the range of the protein concentrations used. Note that the final ionic strength of the buffer is 210 mM (calculated from Thiede *et al.*, 2013⁴⁷), close to physiological one. For this assay, we had to decrease the methylcellulose concentration (0.2%) compared to that used to visualize actin assembly alone (0.3%) in order to avoid unspecific microtubule bundling. At this lower methylcellulose concentration, single actin filaments hardly remained in the TIRF field, unless they were bound to microtubules and/or bundled. The concentration of actin was 0.4 μ M in all conditions. In control experiments without tau or in the presence of fascin (1 μ M), tubulin was polymerized at 20 μ M. In the presence of 4R-tau (0.7 μ M), we decreased the tubulin concentration to 5 μ M (tubulin:tau ratio of 7:1), in order to avoid extensive microtubule nucleation that occurred upon the addition of tau and rendered the analysis of microtubule/F-actin interactions impossible. The tau constructs differentially affected microtubule self-assembly. In particular, deletion of the repeats reduced the ability of tau to promote tubulin nucleation. The ratios of tubulin to tau proteins were thus held at 7:1 but adjusted as follows: 5 μ M tubulin for 0.7 μ M Δ N-tau, 15 μ M tubulin for 2.1 μ M 3R-tau, 20 μ M tubulin for 2.8 μ M 2R-tau and 21.5 μ M tubulin for 3 μ M 1R-tau or 0R-tau. This ensured that, for each tau construct, tubulin and actin polymerization roughly started at the same time. Samples were visualized on an inverted microscope (Eclipse Ti, Nikon) equipped with an iLas² TIRF system (Roper Scientific), a cooled charged-coupled device camera (EMCCD Evolve 512, Photometrics) with 512 $\times$ 512-pixel imaging array (16 $\times$ 16 μ m pixels), a warm stage controller (LINKAM MC60), and controlled by MetaMorph software (version 7.7.5, Molecular Devices). Samples were excited with 491- and 561 nm lasers and observed using an Apochromat 60X oil immersion objective (NA 1.49). Dual-color time-lapse imaging (488 and 561 nm) was performed at 32 °C for actin/tubulin co-assembly and 26 °C for actin polymerization, during 45 min at 1 frame per 5 s with a 100 ms exposure time.

Image analysis. All image analysis was performed using ImageJ⁴⁸. To quantify microtubule/actin overlap, masks corresponding to the actin and microtubule networks were generated with a homemade ImageJ macro and used to measure the surface of microtubules co-localizing with F-actin on each stack image. The ratio of the microtubule surface co-localized with actin to the total surface of the microtubule network was represented as a function of the total microtubule network surface. To compare the microtubule/actin co-localization induced by each tau-deleted forms, the same procedure was applied to images with similar microtubule densities. Results were averaged from at least three independent experiments. The elongation rates of microtubules (either single or associated with F-actin) and of F-actin

polymerizing along microtubule tracks were determined on kymographs using ImageJ software and a homemade KymoTool. Because single actin filaments were very motile, their elongation rate was derived from actin length measurements on image stacks. To evaluate F-actin curvature in presence or absence of tau, the masks (generated as explained above) of actin networks were skeletonized. Actin filament segments between crossings were recovered, manually traced and interpolated. The sum of the angles formed by 3 consecutive points (10 pixels apart) along the selected line was calculated and divided by the length of the line. Thus the calculated curvature is as small as the line is straight and long. The procedure was applied to actin networks co-assembled with tubulin in presence of either fascin or tau, and on images exhibiting similar microtubule densities.

Statistical analysis. All statistical analysis was performed as implemented in Prism 6.0 (GraphPad Software, La Jolla, USA).

References

- Rodriguez, O. C. *et al.* Conserved microtubule – actin interactions in cell movement and morphogenesis. *Nat. Cell. Biol.* **5**, 599–609 (2003).
- Hoogenraad, C. C. & Bradke, F. Control of neuronal polarity and plasticity—a renaissance for microtubules? *Trends Cell Biol.* **19**, 669–76 (2009).
- Geraldo, S. & Gordon-Weeks, P. R. Cytoskeletal dynamics in growth-cone steering. *J. Cell Sci.* **122**, 3595–604 (2009).
- Rochlin, M. W., Dailey, M. E. & Bridgman, P. C. Polymerizing microtubules activate site-directed F-actin assembly in nerve growth cones. *Mol. Biol. Cell.* **10**, 2309–2327 (1999).
- Dent, E. W. & Kalil, K. Axon Branching Requires Interactions between Dynamic Microtubules and Actin Filaments. *J. Neurosci.* **21**, 9757–9769 (2001).
- Schaefer, A. W., Kabir, N. & Forscher, P. Filopodia and actin arcs guide the assembly and transport of two populations of microtubules with unique dynamic parameters in neuronal growth cones. *J. Cell Biol.* **158**, 139–152 (2002).
- Weingarten, M. D., Lockwood, A. H., Hwo, S. & Kirschner, M. W. A protein factor essential for microtubule assembly. *PNAS* **72**, 1858–1862 (1975).
- Cleveland, D. W., Hwo, S. & Kirschner, M. W. Purification of Tau, a Microtubule-associated Protein that Induces Assembly of Microtubules from Purified Tubulin. *J. Mol. Biol.* **116**, 207–225 (1977).
- Chen, J., Kanai, Y., Cowan, N. J. & Hirokawa, N. Projection domains of MAP2 and tau determine spacings between microtubules in dendrites and axons. *Nature* **360**, 674–677 (1992).
- Drechsel, D. N., Hyman, A. A., Cobb, M. H. & Kirschner, M. W. Modulation of the Dynamic Instability of Tubulin Assembly by the Microtubule-Associated Protein Tau. *Mol. Biol. Cell.* **3**, 1141–1154 (1992).
- Trinczek, B., Biernat, J., Baumann, K., Mandelkow, E. & Mandelkow, E. Domains of Tau Protein, Differential Phosphorylation, and Dynamic Instability of Microtubules. *Mol. Biol. Cell.* **6**, 1887–1902 (1995).
- Binder, L. I., Frankfurter, A. & Rebhun, L. I. The Distribution of Tau in the Mammalian Central Nervous System. *J. Cell. Biol.* **101**, 1371–1378 (1985).
- Brandt, R. & Lee, G. The balance between tau protein's microtubule growth and nucleation activities: implications for the formation of axonal microtubules. *J. Neurochem.* **61**, 997–1005 (1993).
- Avila, S., Lucas, J., Perez, M. & Hernandez F. Role of Tau Protein in Both Physiological and Pathological Conditions. *Physiol. Rev.* **84**, 361–384 (2004).
- Goedert, M. & Spillantini, M. G. A Century of Alzheimer's Disease. *Science* **314**, 777–781 (2006).
- Griffiths, L. M. & Pollards, D. The Interaction of Actin Filaments with Microtubules and Microtubule-associated Proteins. *J. Biol. Chem.* **257**, 9143–9151 (1982).
- Fulga, T. a. *et al.* Abnormal bundling and accumulation of F-actin mediates tau-induced neuronal degeneration in vivo. *Nat. Cell Biol.* **9**, 139–48 (2007).
- He, H. J. *et al.* The proline-rich domain of tau plays a role in interactions with actin. *BMC Cell Biol.* **10**, 81 (2009).
- Correas, I., Padilla, R. & Avila, J. The tubulin-binding sequence of brain microtubule-associated proteins, tau and MAP2, is also involved in actin binding. *J. Biochem.* **269**, 61–64 (1990).
- Moraga, D. M., Nuñez, P., Garrido, J. & Maccioni, R. B. A tau fragment containing a repetitive sequence induces bundling of actin filaments. *J. Neurochem.* **61**, 979–986 (1993).
- Roger, B., Al-Bassam, J., Dehmelt, L., Milligan, R. & Halpain, S. MAP2c, but not tau, binds and bundles F-actin via its microtubule binding domain. *Curr. Biol.* **14**, 363–71 (2004).
- Yu, J.-Z. & Rasenick, M. M. Tau associates with actin in differentiating PC12 cells. *FASEB J.* **20**, 1452–61 (2006).
- Frändemich, M. L. *et al.* Activity-dependent tau protein translocation to excitatory synapse is disrupted by exposure to amyloid-beta oligomers. *J. Neurosci.* **34**, 6084–97 (2014).
- Black, M. M., Moshiah, S. & Obrocka, M. Tau is enriched on dynamic microtubules in the distal region of growing axons. *J. Neurosci.* **76**, 3601–3619 (1996).
- Li, L., Fothergill, T., Hutchins, B. I., Dent, E. W. & Kalil, K. Wnt5a evokes cortical axon outgrowth and repulsive guidance by tau mediated reorganization of dynamic microtubules: Wnt5a Regulates Growth Cone MTs via Tau. *Dev. Neurobiol.* **74**, 797–817 (2014).
- Butner, K. A. & Kirschner, M. W. Tau Protein Binds to Microtubules through a flexible array of distributed weak sites. *J. Cell. Biol.* **115**, 717–730 (1991).
- Goode, B. L. & Feinstein, S. C. Identification of a novel microtubule binding and assembly domain in the developmentally regulated inter-repeat region of tau. *J. Cell. Biol.* **124**, 769–782 (1994).
- Mukrasch, M. D. *et al.* The 'jaws' of the tau-microtubule interaction. *J. Biol. Chem.* **282**, 12230–9 (2007).
- Edwards, R. A. & Bryan, J. Fascins, a family of actin bundling proteins. *Cell. Motil. Cytoskeleton* **32**, 1–9 (1995).
- Rosenberg, K. J., Ross, J. L., Feinstein, H. E., Feinstein, S. C. & Israelachvili, J. Complementary dimerization of microtubule-associated tau protein: Implications for microtubule bundling and tau-mediated pathogenesis. *PNAS* **105**, (2008).
- Lee, S. & Kolodziej, P. A. Short Stop provides an essential link between F-actin and microtubules during axon extension. *Development* **129**, 1195–1204 (2002).
- Sanchez-Soriano, N. *et al.* Mouse ACF7 and drosophila short stop modulate filopodia formation and microtubule organisation during neuronal growth. *J. Cell. Sci.* **122**, 2534–2542 (2009).
- Geraldo, S., Khanzada, U. K., Parsons, M., Chilton, J. K. & Gordon-Weeks, P. R. Targeting of the F-actin-binding protein drebrin by the microtubule plus-tip protein EB3 is required for neuritogenesis. *Nat. Cell. Biol.* **10**, 1181–1189 (2008).

34. Morris, M., Maeda, S., Vossell, K. & Mucke, L. The many faces of tau. *Neuron* **70**, 410–26 (2011).
35. Kiris, E. *et al.* Combinatorial Tau pseudophosphorylation: markedly different regulatory effects on microtubule assembly and dynamic instability than the sum of the individual parts. *J. Biol. Chem.* **286**, 14257–70 (2011).
36. López, M. P. *et al.* Actin–microtubule coordination at growing microtubule ends. *Nat. Commun.* **5**, (2014).
37. Esmaeli-Azad, B., McCarty, J. H. & Feinstein, S. C. Sense and antisense transfection analysis of tau function: tau influences net microtubule assembly, neurite outgrowth and neuritic stability. *J. Cell. Sci.* **107**, 869–879 (1994).
38. Biernat, J. & Mandelkow, E.-M. The development of cell processes induced by tau protein requires phosphorylation of serine 262 and 356 in the repeat domain and is inhibited by phosphorylation in the proline-rich domains. *Mol. Biol. Cell.* **10**, 727–740 (1999).
39. Drubin, D. G., Feinstein, S. C., Shooter, E. M. & Kirschner, M. W. Nerve growth factor-induced neurite outgrowth in PC12 cells involves the coordinate induction of microtubule assembly and assembly-promoting factors. *J. Cell. Biol.* **101**, 1799–1807 (1985).
40. Ittner, L. M. *et al.* Dendritic function of tau mediates amyloid-beta toxicity in Alzheimer's disease mouse models. *Cell.* **142**, 387–97 (2010).
41. Jaworski, J. *et al.* Dynamic microtubules regulate dendritic spine morphology and synaptic plasticity. *Neuron* **61**, 85–100 (2009).
42. Hu, X., Viesselmann, C., Nam, S., Merriam, E. & Dent, E. W. Activity-dependent dynamic microtubule invasion of dendritic spines. *J. Neurosci.* **28**, 13094–13105 (2008).
43. Reymann, A.-C. *et al.* Turnover of branched actin filament networks by stochastic fragmentation with ADF/cofilin. *Mol. Biol. Cell.* **22**, 2541–2550 (2011).
44. Vignjevic, D. *et al.* Formation of filopodia-like bundles in vitro from a dendritic network. *J. Cell. Biol.* **160**, 951–962 (2003).
45. Hyman, A. *et al.* Preparation of modified tubulins. *Methods Enzymol.* **196**, 478–485 (1991).
46. Portran, D. *et al.* MAP65/Asel promote microtubule flexibility. *Mol. Biol. Cell.* **24**, 1964–1973 (2013).
47. Thiede, C., Lakämper, S., Wessel, A. D., Kramer, S. & Schmidt, C. F. A chimeric kinesin-1 head/kinesin-5 tail motor switches between diffusive and processive motility. *Biophys. J.* **104**, 432–441 (2013).
48. Schneider, C. A., Rasband, W. S. & Eliceiri, K. W. NIH Image to ImageJ: 25 years of image analysis. *Nat. Methods* **9**, 671–675 (2012).

Acknowledgments

We thank Nicolas Sergeant for providing us with His-tagged human 3R- and 4R-tau. We thank Alain Buisson, Fabrice Senger, Virginie Stoppin-Mellet and Marylin Vantard for helpful discussions. We thank Julie Delaroche and Ninon Zala for technical help for protein purification. This work was supported by the Institut National pour la Santé et la Recherche Médicale (INSERM) and the Centre National de la Recherche Scientifique (CNRS) joint ATIP-Avenir program, and the Agence Nationale pour la Recherche (ANR, MALZ 2011, MAALAD program). A.E. was supported by pre-doctoral fellowships from the Région Rhône-Alpes (Program “Cible 2011”) and the Fondation pour la Recherche Médicale (FDT20140930826). E. P. was supported by a pre-doctoral fellowships from the Ministère de l'Enseignement Supérieur et de la Recherche. S. R. R. was supported by post-doctoral fellowships from the Université Joseph Fourier and the ANR (MALZ 2011, MAALAD program). I. A. and L. S. were supported by the CNRS.

Author Contributions

All authors contributed to the design and the interpretation of experiments. A. E., E. P., C. G., S. R. R., L. S. and A. F. L. prepared the reagents, performed the experiments and analysed the data. A.A., L.B. and I.A. analysed the data. A. E. and E. D. performed image analysis. A. E. and I. A. wrote the paper. All authors reviewed the manuscript.

Additional Information

Supplementary information accompanies this paper at <http://www.nature.com/srep>

Competing financial interests: The authors declare no competing financial interests.

How to cite this article: Elie, A. *et al.* Tau co-organizes dynamic microtubule and actin networks. *Sci. Rep.* **5**, 09964; doi: 10.1038/srep09964 (2015).



This work is licensed under a Creative Commons Attribution 4.0 International License. The images or other third party material in this article are included in the article's Creative Commons license, unless indicated otherwise in the credit line; if the material is not included under the Creative Commons license, users will need to obtain permission from the license holder to reproduce the material. To view a copy of this license, visit <http://creativecommons.org/licenses/by/4.0/>

Supplementary Information

Tau co-organizes dynamic microtubule and actin networks

Auréliane Elie^{1,2}, Elea Prezel^{1,2}, Christophe Guérin³, Eric Denarier^{1,2,4}, Sacnicte Ramirez-Rios^{1,2}, Laurence Serre^{1,2}, Annie Andrieux^{1,2,4}, Anne Fourest-Lieuvin^{1,2,4}, Laurent Blanchoin³
and Isabelle Arnal^{1,2,*}

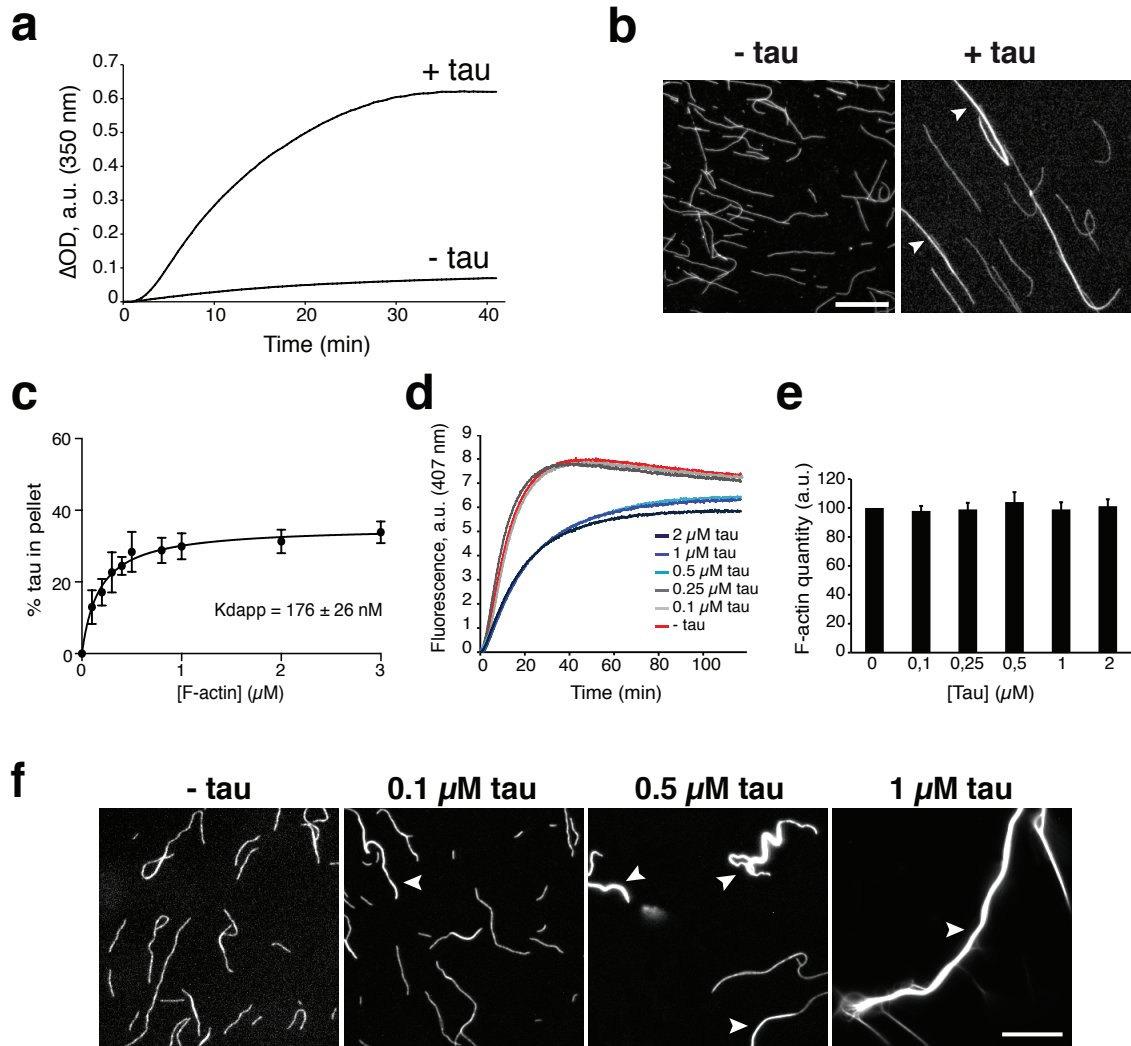
¹Inserm, U836, BP170, 38042 Grenoble, Cedex 9, France

²Université Grenoble Alpes, Grenoble Institut des Neurosciences, BP170, 38042 Grenoble, Cedex 9, France

³Institut de Recherches en Technologies et Sciences pour le Vivant, iRTSV, Laboratoire de Physiologie Cellulaire et Végétale, CNRS/CEA/INRA/UJF, 38054 Grenoble, France

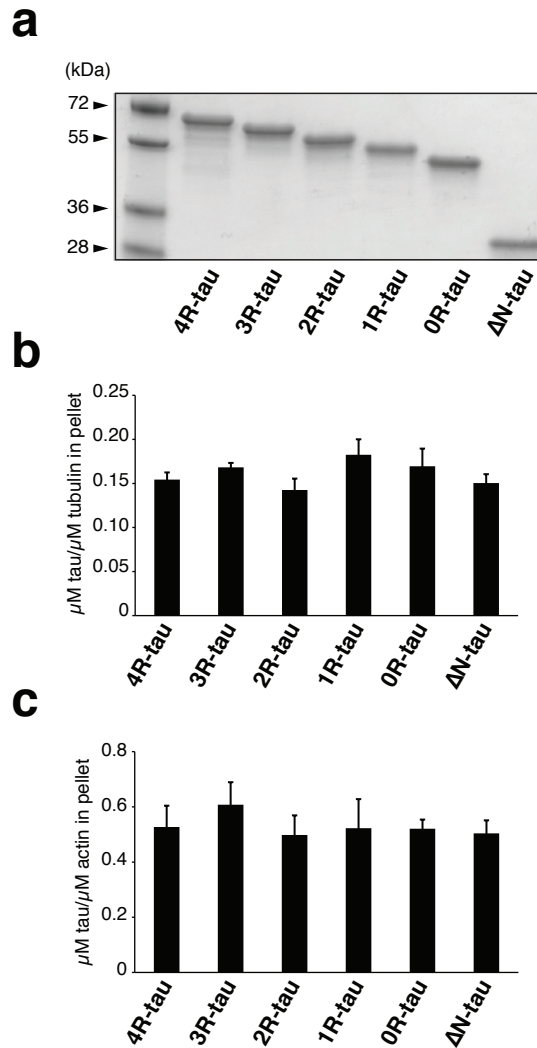
⁴iRTSV, GPC, CEA, 38054 Grenoble, France

*Corresponding author: isabelle.arnal@ujf-grenoble.fr



Supplementary Figure S1. Effects of tau on microtubule and actin assembly.

(a) Turbidity measurements of tubulin polymerization at 350 nm. The addition of tau (1 μM) to tubulin (20 μM) promotes microtubule self-assembly. (b) Fluorescence light microscopy of microtubules polymerized from 60 μM fluorescent tubulin alone (left) or 20 μM fluorescent tubulin with 1 μM tau (right). Samples were fixed and centrifuged onto coverslips before observation. Arrowheads indicate microtubule bundles. Scale bar, 10 μm. (c) Determination of the apparent binding affinity of tau for F-actin in BRB80-K buffer. Increasing concentrations of F-actin were incubated with 0.5 μM tau. The percentage of bound tau was plotted against F-actin concentration and fitted with a hyperbolic function. The Kdapp value was 176 ± 26 nM (mean ± SD, five independent experiments). (d) Time course of actin polymerization (4 μM actin monomers) in the presence of increasing tau concentrations (0.1, 0.25, 0.5, 1 and 2 μM) monitored by pyrene-actin fluorescence. a.u., arbitrary fluorescence units. Tau does not affect actin polymerization, except at concentrations above 1 μM that induce a decrease in the extent of actin assembly. However, quantification of actin polymerization in same conditions by co-sedimentation (e) reveals similar quantities of pelleted F-actin. Quenching of actin-pyrene fluorescence upon tau binding might explain the decrease in fluorescence observed at the highest tau concentrations. (e) Quantification of actin polymerization by high-speed sedimentation assay. Tau was incubated for 5 min with actin under the same conditions as in (d) before being centrifuged. The amount of polymerized F-actin is plotted as a function of tau concentration. Data represent the mean ± SD (three independent experiments). (f) Tau-induced F-actin bundles observed by fluorescence light microscopy. Arrowheads indicate F-actin bundles. Scale bar, 10 μm.



Supplementary Figure S2. Relative binding of tau deleted forms to microtubules and to actin filaments.

(a) Coomassie-stained SDS-PAGE gel showing the different tau proteins used in this study. About 0.7 μg of each protein was loaded. (b) Quantification of the amount of tau proteins bound to microtubules in similar ratio and buffer as the ones used in TIRF microscopy assays (Fig. 3). Tubulin and tau proteins were incubated in BRB80-K buffer supplemented with 1 mM GTP in a 7:1 molar ratio (60 μM tubulin for 8.4 μM tau) for 30 minutes at 32°C. Samples were centrifuged on a 60% sucrose cushion for 30 minutes at 230,000 x g and the pellet and supernatant were separated and quantified after SDS-PAGE. Data represent the mean ± SD (three independent experiments). (c) Quantification of the amount of tau proteins bound to actin filaments in similar ratio and buffer conditions used in TIRF microscopy assays (Fig. 3). Actin (1 μM) was incubated in BRB80-K buffer supplemented with 1 mM GTP for 30 minutes at 32°C with 1.75 μM 4R-tau or ΔN-tau, 5.25 μM 3R tau, 7 μM 2R- or 1R-tau and 7.5 μM 0R-tau. Samples were centrifuged for 30 minutes at 100,000 x g and the supernatants and pellets were separated and quantified after SDS-PAGE. Data represent the mean ± SD (three independent experiments).

Supplementary Methods:

Microtubule self-assembly. For tubulin polymerization, 20 μ M tubulin was incubated with or without 1 μ M 4R-tau at 36°C in BRB80-K buffer supplemented with 1 mM GTP. Microtubule self-assembly was monitored at 350 nm using an UVIKON XS spectrophotometer. Fluorescent microtubules were polymerized in the same conditions in the presence of tubulin containing 10% of ATTO-565 labeled tubulin. One ml of BRB80 buffer containing 0.5% glutaraldehyde and 25% (w/v) sucrose was added to 20 μ l of reactions and the samples were sedimented onto a BRB80-10% glycerol onto coverslips, fixed in methanol and observed by fluorescence microscopy as described in the experimental procedure.

Tau interaction with F-actin in BRB80-K buffer. To determine tau affinity for F-actin in BRB80-K buffer, phalloidin-stabilized F-actin was prepared from 30 μ M G-actin incubated for 1h at RT with 30 μ M phalloidin in AP (Actin Polymerization) buffer. Increasing amounts of phalloidin-stabilized F-actin were incubated with 0.5 μ M 4R-tau in BRB80-K buffer for 30 min at RT. Samples were centrifuged at 100,000 x g for 15 min and the amount of 4R-tau bound to F-actin in the pellets was quantified as described in Methods.

Actin polymerization and bundling. Increasing amounts of 4R-tau was added to 4 μ M G-actin containing 10% of pyrene-labeled G-actin in AP buffer and pyrene fluorescence was measured at 407 nm at RT using a Safas Xenius XC spectrophotometer. To quantify the amount of F-actin polymerized with tau, similar reactions were incubated for 5 min at RT before being centrifuged for 10 min at 100,000 x g. In non-polymerizing conditions (AP buffer without KCl, imidazole, MgCl₂ and EGTA), negligible amount of actin was found in the pellet. To visualize tau-induced F-actin bundles, 4 μ M G-actin was polymerized with

increasing amounts of 4R-tau (0, 0.1, 0.5 and 1 μ M) and 4 μ M phalloidin-ATTO-565 during 30 min at RT before observation under a fluorescence microscope.

Supplementary Movie Legends:

Supplementary Movie S1. Tau promotes the bundling of actin filaments. TIRF movies of actin (0.4 μ M) polymerizing in the absence (left) or in the presence of 0.1 μ M tau (right). The time (min:s) represents the elapsed time from the start of the acquisition. Scale bar, 10 μ m.

Supplementary Movie S2. Tubulin and actin co-assembly in the absence or in the presence of fascin. Dual-color TIRF movies of tubulin (green) and actin (red) co-assembling in the absence (left) or in the presence (right) of fascin. The time (min:s) represents the elapsed time from the start of the acquisition. Scale bar, 10 μ m.

Supplementary Movie S3. Tau co-organizes growing microtubule and actin networks. Dual-color TIRF movie of tubulin (green) and actin (red) co-polymerizing in the presence of tau. The time (min:s) represents the elapsed time from the start of the acquisition. Scale bar, 10 μ m.

Supplementary Movie S4. Detailed views of microtubule/actin coupling in the presence of tau. Dual-color TIRF movies illustrating tau-induced microtubule/actin interactions. Part A shows guided polymerization of F-actin along microtubule tracks. Part B shows the progressive straightening of F-actin by the end of a growing microtubule. Part C shows a microtubule elongating along F-actin bundles. The time (min:s) represents the elapsed time from the start of the events. Scale bar, 5 μ m.

Supplementary Movie S5. The projection domain of tau is not necessary for its microtubule/actin cross-linking activity. Dual-color TIRF movies of tubulin (green) and actin (red) co-assembling in the presence of 4R-tau (left) or Δ N-tau (right). The time (min:s) represents the elapsed time from the start of the acquisition. Scale bar, 10 μ m.

Supplementary Movie S6. The tubulin-binding sites of tau are required to link microtubules and actin filaments. Dual-color TIRF movies of tubulin (green) and actin (red) co-polymerizing with 3R-, 2R-, 1R- or 0R-tau. The time (min:s) represents the elapsed time from the start of the acquisition. Scale bar, 10 μ m.

Résultats complémentaires

1- L'actine inhibe la polymérisation des microtubules induite par tau

En parallèle des résultats présentés dans l'article, nous avons réalisé une étude préliminaire afin de savoir si l'activité de tau sur l'assemblage de la tubuline était influencée par la présence d'actine dans le même milieu. Pour cela, nous avons effectué des tests de polymérisation simultanée de tubuline et d'actine avec ou sans tau, et suivi par mesure de la turbidité à 350 nm la polymérisation des microtubules. La concentration en tubuline est fixée à 30 μ M (proche de la concentration critique), condition dans laquelle la tubuline seule polymérise très peu. Les résultats sont présentés dans la figure 41. La tubuline ne polymérise qu'en présence de tau (Figure 41-A, courbe bleue) et cet effet stimulateur de l'assemblage est diminué en présence d'actine (Figure 41-A, courbe rose). Ces résultats sont confirmés par quantification de la quantité de microtubules après co-sédimentation, montrant que la présence d'actine réduit de 30 % l'assemblage de microtubules par tau (figure 41-B). Des expériences contrôles montrent que l'actine n'influence pas directement la polymérisation des microtubules (Figure 41-C et D).

Ces résultats montrent que l'activité de tau se partage entre les deux polymères, confirmant une interaction directe de tau avec l'actine. Cependant, ces données ne nous permettent pas de conclure sur l'implication éventuelle de tau dans la co-organisation des deux cytosquelettes. Les expériences en TIRF ont donc été essentielles pour affirmer que tau ne régulait pas indépendamment les deux réseaux mais était responsable d'une interaction directe entre les microtubules et les filaments d'actine et était capable de les co-organiser.

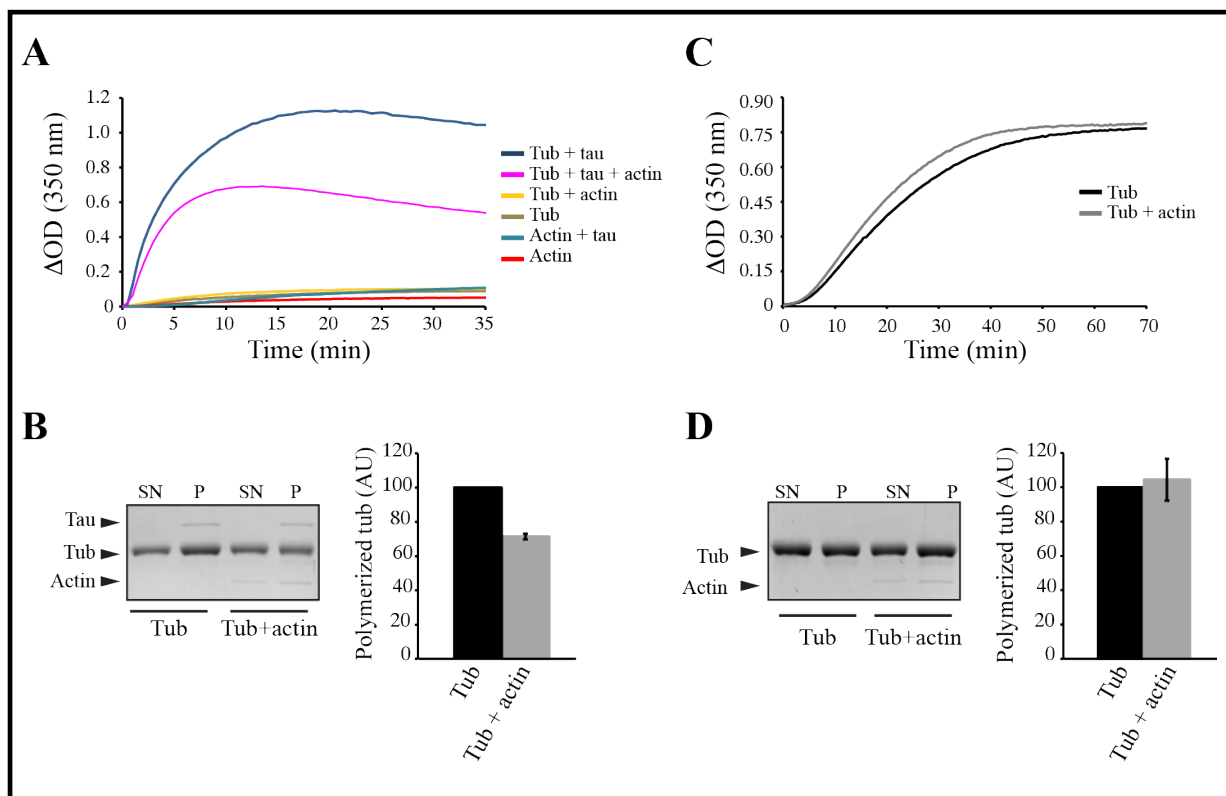


Figure 41. Influence de la polymérisation d'actine sur la polymérisation des microtubules induite par tau. (A) La tubuline à 30 μM est incubée à 35°C avec 2 μM de tau4R, avec (en rose) ou sans (en bleu) la G-actine à 2 μM qui polymérise dans le même tampon que les microtubules (BRB80-K buffer). La turbidité est mesurée à 350 nm. Les solutions contenant de l'actine seule, de l'actine en présence de tau, de la tubuline seule ou de la tubuline en présence d'actine ne montrent pas d'augmentation significative de turbidité. (B) Les mêmes réactions que celles réalisées en (A) sont centrifugées à 210 000 $\times g$ pendant 30 min sur un coussin de BRB80-60 % sucrose (20 μL réaction sur 80 μL coussin) afin de quantifier la quantité de microtubules polymérisés. Représenté : moyenne $\pm$ SD, $n=4$ expériences), p value < 0,05 (test de Wilcoxon). (C) La tubuline à 70 μM , polymérisant sans facteur extérieur, est incubée avec (en gris) ou sans (en noir) 2 μM de G-actine. (D) Quantification sur gel des microtubules formés après centrifugation dans les mêmes conditions qu'en (B). Les différences obtenues ne sont pas significatives. Ces résultats montrent que la polymérisation des microtubules ne dépend donc pas de la seule présence d'actine.

2- Tau co-localise avec les microtubules et l'actine dans les cônes de croissance de neurones en culture

Au regard des résultats obtenus *in vitro* à partir des protéines purifiées montrant l'activité de tau dans le couplage des réseaux de microtubules et d'actine, nous avons voulu examiner si, dans les neurones, la coexistence de ces trois partenaires était observable. A ce jour, de nombreuses études ont montré la localisation préférentielle de tau le long des microtubules dans les axones. En revanche, l'interaction de tau avec les filaments d'actine dans les neurones reste très peu documentée, bien que des études récentes ont mis en évidence un rôle

régulateur de tau sur le cytosquelette d'actine dans des cellules en culture et dans des modèles animaux (Yu et Rasenick, 2006 ; Fulga et al, 2007 ; Frandemiche et al, 2014). Nous avons donc examiné la distribution de la protéine tau endogène sur l'actine et les microtubules dans des neurones hippocampaux de souris en culture primaire durant les premiers stades de leur différenciation (Figure 42). Après deux jours en culture (2 DIV), l'axone et de courtes dendrites émergent à partir du corps cellulaire du neurone (Figure 42-A). Les microtubules s'organisent en faisceaux denses au sein des corps de l'axone et des dendrites, alors que les filaments d'actine prédominent dans les lamellipodes et les filopodes des cônes de croissance. Comme attendu, tau est présente le long des microtubules dans les axones mais semble aussi co-localiser de façon ponctuelle le long des filaments d'actine dans le cône de croissance, alors que les microtubules sont exclus de cette zone (Figure 42-B). Pour confirmer l'interaction directe entre tau et ces filaments d'actine, nous avons réalisé des expériences de FRET par photo-blanchiment de l'accepteur (FRET-AB, pour FRET by acceptor photobleaching) (Figure 42-C et D) entre le fluorophore Alexa-488 marquant tau (donneur) et la phalloïdine-ATTO-565 marquant les filaments d'actine (accepteur). Au sein des régions du cône de croissance ayant subi une extinction de l'accepteur, l'intensité de fluorescence du donneur augmente significativement, avec une efficacité de FRET de $21 \pm 0.8 \%$ (moyenne $\pm$ SEM, $n=53$). Ceci montre que l'anticorps secondaire lié à tau et la phalloïdine liée à l'actine sont séparés d'une distance inférieure à 10 nm, supportant l'idée d'une interaction directe entre tau et les filaments d'actine. Nous avons également observé une triple co-localisation entre tau, les microtubules et l'actine au sein du cône de croissance, concordant avec l'idée que les microtubules dynamiques sont capables d'entrer transitoirement dans le cône de croissance et se co-aligner avec les faisceaux d'actine dans les filopodes (Figure 42-E) (Geraldo et Gordon-Weeks, 2009). Les profils d'intensité de l'actine, des microtubules et de tau au sein des filopodes indiquent que tau se localise sur l'actine et parfois à la fois sur l'actine et les microtubules (Figure 42-F). Ces résultats renforcent l'idée que tau pourrait contribuer au co-alignement et donc à la coopération entre les cytosquelettes de microtubules et d'actine au sein du cône de croissance nécessaires au développement des neurones (Schaefer et al, 2008 ; Geraldo et Gordon-Weeks 2009).

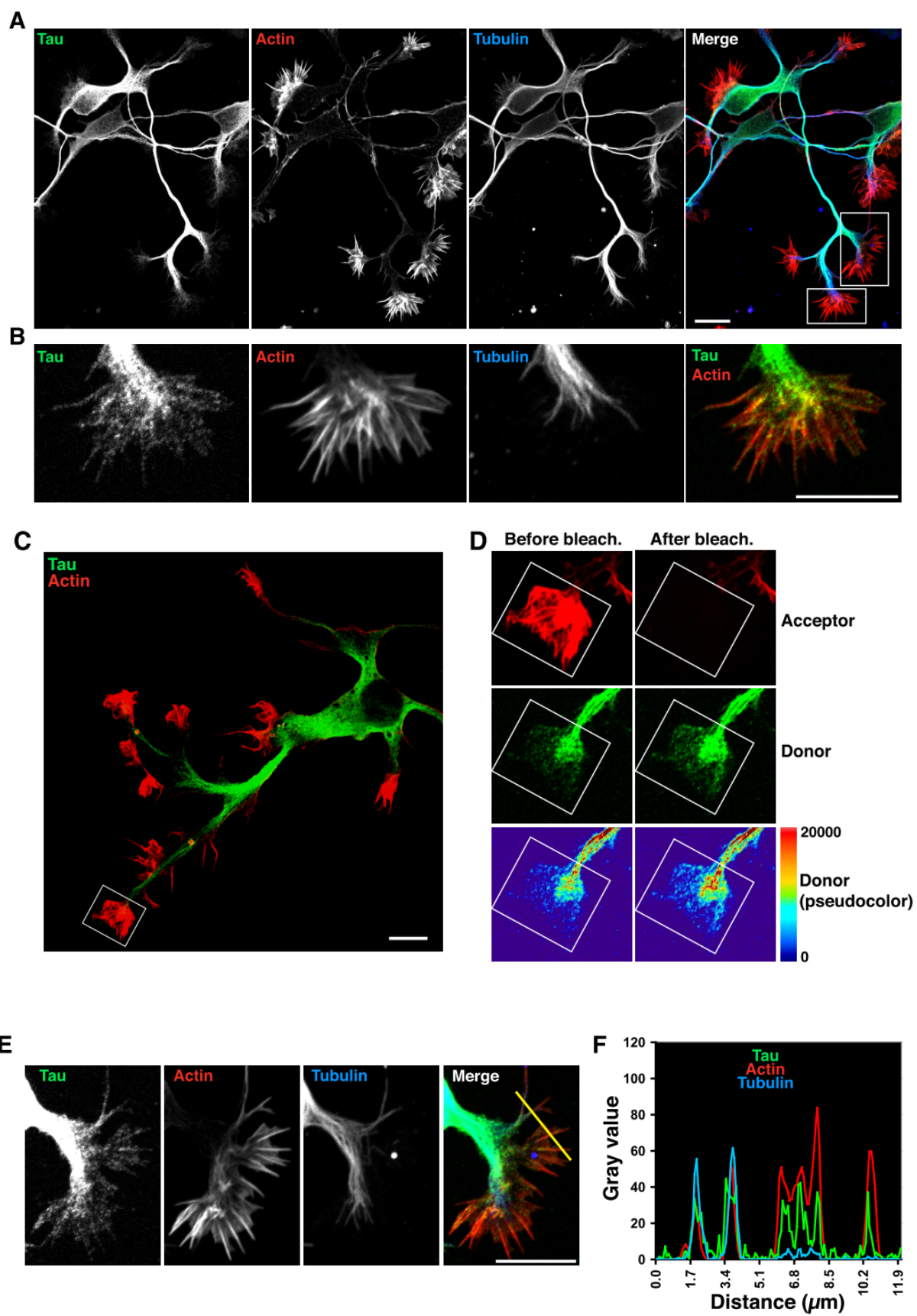


Figure 42. Tau co-localise et interagit avec l'actine des cônes de croissance de neurones en culture primaire. (A) Images par microscopie confocale d'un neurone entier à 2 DIV. Tau en vert, tubuline en bleu, actine en rouge. Bar d'échelle : 10 μ m. (B) Grossissement d'un cône de croissance montrant les marquages de tau, des microtubules et de l'actine, et une image montrant la superposition des marquages de tau et de l'actine. (C, D) Expérience de FRET-AB sur des neurones à 2 DIV (C). Les images de l'accepteur (les filaments d'actine) et du donneur (tau) avant (à gauche) et après (à droite) la photo-extinction sont montrées (D). Des images en pseudo-couleurs indiquent une augmentation de l'intensité de fluorescence du donneur après extinction de l'accepteur. L'efficacité de FRET entre le donneur et l'accepteur est de $21 \pm 0.8 \%$ (moyenne $\pm$ SEM, n=53 cônes de croissance) alors qu'elle est de $-3 \pm 0.8 \%$ (n=26 cônes de croissance) pour le contrôle, c'est-à-dire dans des zones non photo-éteintes du même neurone. Bar d'échelle : 5 μ m. Ces mesures suggèrent une forte proximité entre tau et les filaments d'actine. (E) Grossissement d'un autre cône de croissance montrant les marquages de tau, des microtubules et de l'actine, et une image montrant la superposition des trois marquages. (F) Graphe des variations de l'intensité de fluorescence de tau, la tubuline et l'actine suivant une ligne (en jaune) tracée sur l'image de superposition en (E). Tau co-localise avec à la fois l'actine et les microtubules (à gauche) et avec l'actine uniquement (à droite).

Chapitre IV:

Conclusions et perspectives

Au cours de ma thèse, j'ai essayé de mieux comprendre comment tau organise l'assemblage des complexes macromoléculaires microtubules/microtubules et microtubules/actine.

I- Tau et les faisceaux de microtubules

1. Reconstitution de faisceaux de microtubules dynamiques en présence de tau

Grâce à la mise au point de conditions permettant de suivre en temps réel la formation de faisceaux de microtubules en présence de tau, nous avons montré que l'isoforme 1N4R de tau induit, *in vitro*, le co-alignement de deux ou plusieurs microtubules en faisceaux lorsqu'ils se rencontrent à des angles inférieurs à 25°. Lorsque tau est dépourvue de son domaine de projection, la valeur de ces angles peut aller jusqu'à doubler et, de plus, la fréquence d'évènements de co-alignement est fortement augmentée pour une tranche d'angles donnée, impliquant que le domaine N-terminal de tau a un effet inhibiteur sur la formation des faisceaux. Ce résultat est en contradiction avec un modèle récent proposé par Rosenberg et al. (2008) qui, en mimant les microtubules par des surfaces de mica, postulait que la dimérisation du domaine de projection de tau était nécessaire à la formation des faisceaux de microtubules. De même, nos données ne sont pas en accord avec les conclusions des résultats obtenus en cellules après transfection de différentes constructions de tau montrant que le domaine de projection et la queue C-terminale n'influençaient pas (Preuss et al., 1997) ou étaient nécessaires à la formation des faisceaux de microtubules (Kanai et al., 1992). Nos résultats sont par contre cohérents avec des études initiales par microscopie électronique (Scott et al., 1992 ; Gustke et al., 1994) qui, à partir de microtubules stabilisés au taxol ou co-assemblés avec tau, proposaient que l'organisation des microtubules en faisceaux était inhibée par le domaine de projection de tau et nécessitait la présence des 4 motifs répétés et d'une partie du R' de tau. Cependant, Brand et Lee (1993) faisait l'hypothèse que la présence des domaines N-terminal et C-terminal empêchaient complètement la formation de faisceaux puisque la protéine tau entière n'était pas capable d'assurer ce processus. Par ailleurs, Kanai et al. (1992) suggéraient que la totalité de la région riche en prolines (PRD) était essentielle à l'organisation des microtubules en faisceaux. Or, nous avons identifié un domaine minimal, correspondant au fragment dépourvu du PRD et de la queue C-terminale (Δ NC-tau) suffisant pour former des faisceaux. Ce résultat est également en désaccord avec une autre étude (Preuss et al., 1997) affirmant que la présence des deux régions flanquantes du MTBD (PRD et séquence R') était indispensable à ce phénomène. A l'inverse, il a été montré beaucoup plus récemment qu'un fragment de tau contenant une partie du PRD (domaine P2) et les deux

premières répétitions induisait la formation de faisceaux (Fauquant et al., 2011). Ces nombreuses divergences de conclusions sur le rôle des différents domaines de tau viennent probablement de l'utilisation d'approches différentes (étude en cellule ou *in vitro*, estimation des faisceaux par microscopie électronique ou diffusion de lumière, utilisation de microtubules stabilisés ou co-polymérisés avec tau). Aucun des résultats précédents n'a été déduit de la visualisation en temps réel de la formation des faisceaux de microtubules, ni d'une analyse précise des paramètres impliqués dans ce processus (mesure d'angles, proportion d'évènements de co-alignement par rapport à la totalité des évènements...). L'approche par microscopie TIRF permet donc d'évaluer très précisément la capacité d'une MAP à former des faisceaux dans des conditions dynamiques. Cette technique offre en outre l'avantage de s'affranchir de l'étape de nucléation grâce aux amorces de microtubules, qui nous permettent par ailleurs d'identifier la polarité des microtubules.

2. Mécanisme de formation des faisceaux via les PHFs

Nous avons également pu déterminer que les domaines PHFs présents dans les répétitions de tau et responsables de l'agrégation pathologique de tau dans la maladie d'Alzheimer ont un rôle essentiel dans la constitution des faisceaux de microtubules par tau, et particulièrement le second domaine, situé au début de la troisième répétition (R3) du domaine de liaison aux microtubules de tau. La présence de ce PHF chez tau 1N3R peut expliquer la capacité de cette isoforme à former des faisceaux avec la même efficacité que tau 1N4R. A l'heure actuelle, plusieurs mécanismes peuvent être proposés pour expliquer comment les domaines PHFs influencent l'organisation des microtubules en faisceaux. Des études récentes par RMN ont montré la forte affinité de ces domaines pour les microtubules ainsi que leur conformation particulière en épingle servant de « crochets » pour maintenir tau à la surface du polymère (Mukrasch, 2009 ; Kadavath et al., 2015a et b). Ainsi, on peut penser que le domaine PHF localisé dans R3 représenterait un site majeur d'ancrage de la protéine tau sur un microtubule et, en influençant la conformation des zones flexibles voisines, pourrait répartir ses autres domaines de liaison aux microtubules sur le microtubule adjacent (voir Fig. 4A, chapitre II, p. 124). Une autre hypothèse est que, compte-tenu de leur capacité à s'organiser en feuillets beta, les domaines PHFs de deux protéines tau puissent dimériser et former un pont entre deux microtubules. Ce mécanisme suppose un détachement d'au moins un des domaines PHF du microtubule, et donc une affinité entre séquences PHFs de deux molécules de tau plus grande que leur affinité pour les microtubules (voir Fig. 4A, chapitre II, p. 124). Ceci pourrait être facilité par une augmentation locale de la concentration de tau au

moment où deux microtubules sont à proximité l'un de l'autre. Cette affinité différentielle tau/tau versus tau/microtubule est difficilement mesurable. Il a par ailleurs été reporté que le domaine PHF6 (dans R3) avait une plus grande tendance à oligomériser et à agréger que le domaine PHF6* (dans R2) (Sahara et al., 2007 ; Ganguly et al., 2015), en accord avec le rôle plus important du domaine PHF6 dans la formation des faisceaux de microtubules. Il pourrait être intéressant de se demander si la différence constatée dans la capacité à former des faisceaux entre les deux domaines PHFs est spécifique de leur séquence (différant par seulement deux acides aminés), et donc irait dans le sens d'une oligomérisation de tau, ou provient plutôt de leur localisation au sein de la protéine. Pour cela, il faudrait inverser les deux domaines, ou en déléter un et remplacer le restant par l'autre domaine. De plus, il a été montré que l'insertion d'un résidu proline dans les séquences PHF les empêchait de s'arranger en feuillet beta (von Bergen et al., 2001 ; Ganguly et al., 2015). Nous pourrions examiner si l'introduction d'une proline dans l'un ou les deux motifs PHF aurait un impact sur la formation des faisceaux de microtubules en TIRF. D'autre part, pour répondre à la question de l'état monomérique ou dimérique de tau dans les faisceaux de microtubules, nous envisageons de visualiser directement tau en cryo-EM en la marquant avec des nanoparticules d'or au niveau de son His-Tag (avec une stœchiométrie contrôlée de une nanoparticule par protéine). Nous avons déjà déterminé les conditions par fluorescence classique permettant la formation de faisceaux de microtubules en présence d'une quantité minimale de tau, afin d'observer un signal spécifique en cryo-EM. Nous pourrions également conduire une étude en molécule unique par microscopie TIRF, et comparer les signaux de fluorescence de tau sur des microtubules isolés ou en faisceau. Une étude similaire a été réalisée avec la MAP65 et a permis de démontrer la dimérisation de cette MAP lors de la formation des faisceaux de microtubules (Tulin et al., 2012). Une telle approche nécessite l'obtention d'une protéine tau marquée avec une unique molécule fluorescente, étape qui est à ce jour encore problématique car, si la protéine n'est pas dégradée dans la bactérie, son activité après purification est fortement réduite comparée à une protéine non marquée. Toutefois, le fragment Δ N-tau couplé à la GFP a pu être produit récemment au laboratoire et des expériences par TIRF ont montré que sa capacité à former des faisceaux de microtubules reste inchangée comparée à celle de la forme Δ N-tau. Des expériences en molécules uniques pourront donc être réalisées avec cette forme tronquée de tau afin de déterminer d'une part sa dynamique d'interaction avec les microtubules isolés ou en faisceaux et d'autre part son état de dimérisation grâce à la mesure de son intensité de fluorescence.

3. Rôle du domaine de projection de tau dans la formation des faisceaux

Le domaine de projection de tau régule négativement la formation des faisceaux puisque sa délétion stimule fortement le pontage entre microtubules. Les résultats de cryo-EM montrent que la protéine tau entière et sa forme délétée du domaine de projection (Δ N-tau) ont un effet similaire sur le réseau surface des microtubules (augmentation du nombre de protofilaments par rapport à la tubuline seule) ainsi que sur l'espacement inter-microtubules dans les faisceaux (11 nm en présence de 4R- et Δ N-tau). Ces résultats permettent dans un premier temps d'expliquer l'augmentation de rigidité des microtubules observée en présence de tau et de son domaine MTBD (Felgner et al., 1997). Ils montrent également que le domaine de projection en lui-même n'influence pas l'espacement entre les microtubules. L'ensemble de cette analyse structurale suggère que l'effet stimulateur de Δ N-tau sur la formation des faisceaux est indépendant d'un effet différentiel sur la structure interne des microtubules par rapport à la tau entière. Cet effet serait donc plutôt dû à une conformation différente de la forme délétée qui serait plus favorable au pontage. En accord avec ceci, des études montrent que tau aurait une conformation repliée avec les domaines N- et C-terminal masquant partiellement les répétitions, ce qui pourrait réduire le degré de flexibilité des répétitions, limitant ainsi l'angle possible de co-alignement entre deux microtubules et la probabilité de ponter les microtubules dans une tranche d'angle donnée. La délétion du domaine de projection chargé négativement pourrait également expliquer l'inhibition de la formation des faisceaux en repoussant la surface négative du microtubule (Fig. 4B, chapitre II, p.124).

A ce jour, peu de mécanismes sont connus pour expliquer l'organisation des microtubules en faisceaux induits par les MAPs, hors moteurs moléculaires. MAP2 pourrait former un dimère entre deux microtubules via son domaine de projection mais cela reste controversé (Wille et al., 1992 ; Burgin et al., 1994). Le mode d'action de la MAP65 a été caractérisé plus en détail, avec une flexibilisation des microtubules et une dimérisation de la MAP permettant les ponts entre microtubules (Gaillard et al., 2008 ; Tulin et al., 2012 ; Portran et al., 2013). Notre étude suggère que tau présente un mécanisme distinct de celui de la dimérisation par son domaine de projection.

4. Dissociation des activités de tau : pontage et/ou stabilisation des microtubules ?

La question qui se pose ensuite est de comprendre comment tau corrèle ses deux activités régulatrices des microtubules (stabilisation et formation de faisceaux) et plus particulièrement, le rôle de la phosphorylation dans cette régulation. Il serait intéressant d'étudier l'effet de la phosphorylation de tau sur l'organisation en faisceaux des microtubules, puisque l'on sait que

sa phosphorylation peut augmenter la dynamique des microtubules. Une première étude avec un mutant pseudo-phosphorylé sur la sérine 262 (dans le domaine R1) a été conduite au laboratoire et montre que les microtubules sont beaucoup plus dynamiques qu'en présence de la protéine tau non phosphorylée. Par contre, la capacité de cette tau pseudo-phosphorylée à arranger les microtubules en faisceaux n'est pas modifiée (même proportion globale d'évènements de co-alignement, même répartition d'angles, même angle maximal), conduisant à la formation de faisceaux de microtubules dynamiques. Cette phosphorylation nous montre donc qu'il est possible de dissocier les deux activités principales de tau : stabilisation et organisation en faisceaux des microtubules. Au cours du développement neuronal, cette dissociation pourrait augmenter la dynamicité des faisceaux et permettre aux microtubules présentant une extrémité libre en bordure du faisceau d'explorer l'espace plus efficacement, mécanisme qui peut être nécessaire pour atteindre des cibles spécifiques au niveau du cône de croissance. De plus, le domaine de projection de tau comprend de nombreux sites de phosphorylation. Il serait intéressant d'étudier le rôle de ces phosphorylations sur l'organisation des microtubules en faisceaux *in vitro*, afin de déterminer si elles pourraient atténuer ou renforcer l'effet inhibiteur du domaine N-terminal de tau sur la formation des faisceaux. Ces études sont en cours au laboratoire. De même, nous avons vu que l'isoforme tau3R, qui est la première exprimée dans le développement, rendait les faisceaux plus dynamiques que ceux formés avec tau4R. Il pourrait donc être intéressant de suivre, pendant la formation de l'axone, l'évolution de la dynamique des microtubules à l'intérieur des faisceaux, afin de relier éventuellement cette propriété à l'état de phosphorylation de tau qui varie au cours du développement neuronal (Goedert et al., 1989), ou la relier à l'expression des différentes isoformes de tau.

Plus généralement, il pourrait être intéressant d'étudier le rôle des autres isoformes de tau sur la formation des faisceaux, et particulièrement l'effet du nombre de répétitions N dans le domaine N-terminal (0, 1, ou 2). En effet, nous n'avons étudié que les isoformes 1N et, à l'heure actuelle, on possède très peu d'informations sur le rôle de ces motifs répétés. L'isoforme 0N3R, par exemple, seule forme de tau exprimée au stade fœtal, pourrait posséder une capacité de formation de faisceaux de microtubules diminuée par rapport aux autres isoformes, ce qui serait en corrélation avec une rigidité moindre de l'axone à cette étape de développement.

De manière intéressante, notre étude des formes tronquées de tau (Δ N-tau et Δ NC-tau) nous a permis de montrer que, sans son domaine de projection, l'activité de tau est stimulée

par rapport à la protéine entière puisque, en particulier, elle forme des faisceaux de microtubules plus efficacement. Des études récentes ont également mis en évidence un effet augmenté de fragments de tau délétés de leur domaine N-terminal sur l'assemblage de la tubuline ou la stabilisation des microtubules (Zilka et al., 2006 ; Derisbourg et al., 2015). Ainsi, ces résultats suggèrent que ces protéines tronquées, sous leur forme soluble, donc avant d'être agrégées, pourraient participer à un gain toxique de fonction de tau sur les microtubules en conditions pathologiques.

II. Tau et l'interaction microtubules/actine

Contrairement à ce qui avait été admis pendant des années, tau n'est pas une protéine uniquement axonale et a été retrouvée dans les épines dendritiques, d'abord dans des conditions pathologiques (Ittner et al., 2010) puis physiologiques (Frandemiche et al., 2014). Nous avons montré que tau interagit directement avec les filaments d'actine qu'elle peut organiser en réseau dense, et qu'elle induit le co-alignement et la croissance couplée des réseaux d'actine et de microtubules. L'utilisation de différents mutants de tau nous a permis de montrer que tau est toujours capable de co-aligner les microtubules et l'actine avec seulement deux répétitions, nous amenant à proposer un modèle selon lequel la répartition des domaines répétés permettrait l'interaction entre les microtubules et l'actine. Le pontage entre microtubules et actine semble donc être moins stringent que le pontage de plusieurs microtubules entre eux puisque ce dernier est significativement affecté en l'absence des deux répétitions centrales. Cela pourrait être dû à une flexibilité des filaments d'actine plus importante que celle des microtubules qui faciliterait leur co-alignement avec les microtubules.

Ces résultats soulèvent la question des mécanismes de régulation de tau qui régissent ces fonctions. La régulation par phosphorylation de son action sur le cytosquelette d'actine ainsi que sur l'interaction de celui-ci avec les microtubules constituent une perspective d'étude importante. Cela pourrait nous permettre notamment de disséquer les mécanismes qui contrôlent l'interaction préférentielle de tau avec l'un ou l'autre des cytosquelettes. Des études complémentaires par TIRF à l'aide de mutants pseudo-phosphorylés de tau sur la co-organisation des deux réseaux pourraient apporter des éléments de réponse. La possibilité d'adresser une MAP sur un cytosquelette en particulier a été montrée pour MAP2C, qui, si elle est phosphorylée sur certains sites, interagit préférentiellement avec le cytosquelette d'actine (Ozer et Halpain, 2000). Tau serait davantage phosphorylée dans le cône de croissance que dans le corps de l'axone (Zmuda et Rivas, 2000). On peut donc se demander si

un état de phosphorylation différentiel de tau pourrait soit permettre à tau d'interagir simultanément avec les deux cytosquelettes, soit de transférer la protéine des microtubules entrant dans le cône de croissance aux faisceaux d'actine des filopodes. Un tel mécanisme pourrait également avoir lieu dans les épines dendritiques. Une étude plus fine des co-alignements microtubules/actine dépendants de tau et de sa phosphorylation dans le cône de croissance est nécessaire pour éclaircir le rôle de tau dans l'axogenèse.

Suite à notre étude *in vitro*, il pourrait également être intéressant de visualiser la structure à plus haute résolution des complexes microtubules/actine induits par tau en cryo-EM, pour déterminer des paramètres supplémentaires dans l'organisation de ces complexes (nombre de filaments d'actine par microtubule ? distance entre microtubules et filaments d'actine ?). Nous avons commencé à mettre au point des conditions en coloration négative et pu observer des co-alignements entre microtubules et filaments d'actine en présence de tau.

Par ailleurs, le co-alignement de microtubules et d'actine induit par tau, conduisant l'actine à adopter, la plupart du temps, la forme droite des microtubules, pourrait constituer un système permettant d'étudier en TIRF le comportement dynamique (vitesses) de moteurs moléculaires (myosines ou kinésines) sur ces « rails » mixtes, présentant des propriétés structurales différentes de celles des polymères isolés. Cela nous permettrait de déterminer si, par exemple, le co-alignement des deux cytosquelettes intervenant dans le cône de croissance ou les épines dendritiques faciliterait le déplacement de ces moteurs.

En conclusion, l'ensemble de ces travaux met en évidence le rôle central de tau dans la coordination des cytosquelettes de microtubules et d'actine, coopération nécessaire dans les processus de développement et de consolidation de l'architecture des neurones, et montre l'intérêt d'études futures portant sur la régulation de l'action simultanée de tau sur ces deux réseaux résultant de ses modifications post-traductionnelles. De plus, ces résultats ouvrent de nouvelles voies dans la compréhension des altérations des cytosquelettes d'actine et de microtubules observés dans la maladie d'Alzheimer. Ce travail soulève également de nouvelles questions sur les bases moléculaires de la formation de faisceaux de microtubules par tau, et sur l'éventuelle oligomérisation physiologique de tau via ses domaines PHFs. D'un point de vue structural, l'interaction de tau avec les microtubules reste difficile à appréhender du fait du manque de conformation figée de cette protéine. Cependant, des avancées récentes par résolution de structure en RMN sont prometteuses, même si elles n'ont été conduites pour l'instant qu'à partir de microtubules stabilisés et non co-polymérisés avec tau.

Références

- Aamodt, E.J., and Culotti, J.G. (1986). Microtubules and microtubule-associated proteins from the nematode *Caenorhabditis elegans*: periodic cross-links connect microtubules in vitro. *J. Cell Biol.* *103*, 23–31.
- Abraha, A., Ghoshal, N., Gamblin, T.C., Cryns, V., Berry, R.W., Kuret, J., and Binder, L.I. (2000). C-terminal inhibition of tau assembly in vitro and in Alzheimer's disease. *J. Cell Sci.* *113 Pt 21*, 3737–3745.
- Ahmad, F.J., Echeverri, C.J., Vallee, R.B., and Baas, P.W. (1998). Cytoplasmic dynein and dynactin are required for the transport of microtubules into the axon. *J. Cell Biol.* *140*, 391–401.
- Ahmad, F.J., Yu, W., McNally, F.J., and Baas, P.W. (1999). An essential role for katanin in severing microtubules in the neuron. *J. Cell Biol.* *145*, 305–315.
- Ahmad, F.J., Hughey, J., Wittmann, T., Hyman, A., Greaser, M., and Baas, P.W. (2000). Motor proteins regulate force interactions between microtubules and microfilaments in the axon. *Nat. Cell Biol.* *2*, 276–280.
- Akhmanova, A., and Hoogenraad, C.C. (2005). Microtubule plus-end-tracking proteins: mechanisms and functions. *Curr. Opin. Cell Biol.* *17*, 47–54.
- Akhmanova, A., and Steinmetz, M.O. (2008). Tracking the ends: a dynamic protein network controls the fate of microtubule tips. *Nat. Rev. Mol. Cell Biol.* *9*, 309–322.
- Alberts, B., Bray, D., Lewis, J., Raff, M., Roberts, K., Watson, J.D. (1994). *Molecular Biology of the Cell*. 3rd edition.
- Alzheimer, A., 1907. Über eine eigenartige Erkrankung der Hirnrinde. *Allgemeine Zeitschrift für Psychiatrie*.
- Almo, S.C., Pollard, T.D., Way, M., and Lattman, E.E. (1994). Purification, characterization and crystallization of *Acanthamoeba* profilin expressed in *Escherichia coli*. *J. Mol. Biol.* *236*, 950–952.
- Alonso, A.C., Zaidi, T., Grundke-Iqbal, I., and Iqbal, K. (1994). Role of abnormally phosphorylated tau in the breakdown of microtubules in Alzheimer disease. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* *91*, 5562–5566.
- Alonso, A.D., Grundke-Iqbal, I., Barra, H.S., and Iqbal, K. (1997). Abnormal phosphorylation of tau and the mechanism of Alzheimer neurofibrillary degeneration: sequestration of microtubule-associated proteins 1 and 2 and the disassembly of microtubules by the abnormal tau. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* *94*, 298–303.
- Alonso, A.D., Di Clerico, J., Li, B., Corbo, C.P., Alaniz, M.E., Grundke-Iqbal, I., and Iqbal, K. (2010). Phosphorylation of tau at Thr212, Thr231, and Ser262 combined causes neurodegeneration. *J. Biol. Chem.* *285*, 30851–30860.
- Alonso, A. del C., Zaidi, T., Novak, M., Grundke-Iqbal, I., and Iqbal, K. (2001). Hyperphosphorylation induces self-assembly of τ into tangles of paired helical filaments/straight filaments. *Proc. Natl. Acad. Sci.* *98*, 6923–6928.
- Alushin, G.M., Lander, G.C., Kellogg, E.H., Zhang, R., Baker, D., and Nogales, E. (2014). High-resolution microtubule structures reveal the structural transitions in $\alpha\beta$ -tubulin upon GTP hydrolysis. *Cell* *157*, 1117–1129.
- Amos, L.A., and Schlieper, D. (2005). Microtubules and maps. *Adv. Protein Chem.* *71*, 257–298.
- Amos, L., and Klug, A. (1974). Arrangement of subunits in flagellar microtubules. *J. Cell Sci.* *14*, 523–549.
- Andersen, S.S. (2000). Spindle assembly and the art of regulating microtubule dynamics by MAPs and Stathmin/Op18. *Trends Cell Biol.* *10*, 261–267.
- Andersen, S.S., Buendia, B., Domínguez, J.E., Sawyer, A., and Karsenti, E. (1994). Effect on microtubule dynamics of XMAP230, a microtubule-associated protein present in *Xenopus laevis* eggs and dividing cells. *J. Cell Biol.* *127*, 1289–1299.
- Andreadis, A. (2005). Tau gene alternative splicing: expression patterns, regulation and modulation of function in normal brain and neurodegenerative diseases. *Biochim. Biophys. Acta* *1739*, 91–103.
- Andreadis, A., Brown, W.M., and Kosik, K.S. (1992). Structure and novel exons of the human tau gene. *Biochemistry (Mosc.)* *31*, 10626–10633.

- Andrianantoandro, E., and Pollard, T.D. (2006). Mechanism of actin filament turnover by severing and nucleation at different concentrations of ADF/cofilin. *Mol. Cell* 24, 13–23.
- Arnal, I., Karsenti, E., and Hyman, A.A. (2000). Structural transitions at microtubule ends correlate with their dynamic properties in *Xenopus* egg extracts. *J. Cell Biol.* 149, 767–774.
- Arnal, I., Heichette, C., Diamantopoulos, G.S., and Chrétien, D. (2004). CLIP-170/tubulin-curved oligomers coassemble at microtubule ends and promote rescues. *Curr. Biol. CB* 14, 2086–2095.
- Arriagada, P.V., Growdon, J.H., Hedley-Whyte, E.T., and Hyman, B.T. (1992). Neurofibrillary tangles but not senile plaques parallel duration and severity of Alzheimer's disease. *Neurology* 42, 631–639.
- Asai, D.J., Thompson, W.C., Wilson, L., Dresden, C.F., Schulman, H., and Purich, D.L. (1985). Microtubule-associated proteins (MAPs): a monoclonal antibody to MAP 1 decorates microtubules in vitro but stains stress fibers and not microtubules in vivo. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* 82, 1434–1438.
- Baas, P.W., and Lin, S. (2011). Hooks and comets: The story of microtubule polarity orientation in the neuron. *Dev. Neurobiol.* 71, 403–418.
- Bandyopadhyay, B., Li, G., Yin, H., and Kuret, J. (2007). Tau aggregation and toxicity in a cell culture model of tauopathy. *J. Biol. Chem.* 282, 16454–16464.
- Barth, A.I.M., Siemers, K.A., and Nelson, W.J. (2002). Dissecting interactions between EB1, microtubules and APC in cortical clusters at the plasma membrane. *J. Cell Sci.* 115, 1583–1590.
- Bartles, J.R. (2000). Parallel actin bundles and their multiple actin-bundling proteins. *Curr. Opin. Cell Biol.* 12, 72–78.
- Baskin, T.I. (2001). On the alignment of cellulose microfibrils by cortical microtubules: a review and a model. *Protoplasma* 215, 150–171.
- Al-Bassam, J., Ozer, R.S., Safer, D., Halpain, S., and Milligan, R.A. (2002). MAP2 and tau bind longitudinally along the outer ridges of microtubule protofilaments. *J. Cell Biol.* 157, 1187–1196.
- Bennett, V., Davis, J., and Fowler, W.E. (1982). Brain spectrin, a membrane-associated protein related in structure and function to erythrocyte spectrin. *Nature* 299, 126–131.
- von Bergen, M., Friedhoff, P., Biernat, J., Heberle, J., Mandelkow, E.M., and Mandelkow, E. (2000). Assembly of tau protein into Alzheimer paired helical filaments depends on a local sequence motif ((306)VQIVYK(311)) forming beta structure. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* 97, 5129–5134.
- von Bergen, M., Barghorn, S., Li, L., Marx, A., Biernat, J., Mandelkow, E.M., and Mandelkow, E. (2001). Mutations of tau protein in frontotemporal dementia promote aggregation of paired helical filaments by enhancing local beta-structure. *J. Biol. Chem.* 276, 48165–48174.
- Bernhardt, R., and Matus, A. (1982). Initial phase of dendrite growth: evidence for the involvement of high molecular weight microtubule-associated proteins (HMWP) before the appearance of tubulin. *J. Cell Biol.* 92, 589–593.
- Berry, R.W., Abraha, A., Lagalwar, S., LaPointe, N., Gamblin, T.C., Cryns, V.L., and Binder, L.I. (2003). Inhibition of tau polymerization by its carboxy-terminal caspase cleavage fragment. *Biochemistry (Mosc.)* 42, 8325–8331.
- Bielas, S.L., Serneo, F.F., Chechlac, M., Deerinck, T.J., Perkins, G.A., Allen, P.B., Ellisman, M.H., and Gleeson, J.G. (2007). Spinophilin facilitates dephosphorylation of doublecortin by PP1 to mediate microtubule bundling at the axonal wrist. *Cell* 129, 579–591.
- Bieling, P., Kandels-Lewis, S., Telley, I.A., van Dijk, J., Janke, C., and Surrey, T. (2008). CLIP-170 tracks growing microtubule ends by dynamically recognizing composite EB1/tubulin-binding sites. *J. Cell Biol.* 183, 1223–1233.
- Binder, L.I., Frankfurter, A., Kim, H., Caceres, A., Payne, M.R., and Rebhun, L.I. (1984). Heterogeneity of microtubule-associated protein 2 during rat brain development. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* 81, 5613–5617.
- Black, M.M. (1987). Comparison of the effects of microtubule-associated protein 2 and tau on the packing density of in vitro assembled microtubules. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* 84, 7783–7787.
- Black, M.M., and Baas, P.W. (1989). The basis of polarity in neurons. *Trends Neurosci.* 12, 211–214.
- Black, M.M., Slaughter, T., and Fischer, I. (1994). Microtubule-associated protein 1b (MAP1b) is concentrated in the distal region of growing axons. *J. Neurosci. Off. J. Soc. Neurosci.* 14, 857–870.
- Black, M.M., Slaughter, T., Moshiah, S., Obrocka, M., and Fischer, I. (1996). Tau is enriched on dynamic microtubules in the distal region of growing axons. *J. Neurosci.* 16, 3601–3619.

- Blanchoin, L., Amann, K.J., Higgs, H.N., Marchand, J.B., Kaiser, D.A., and Pollard, T.D. (2000a). Direct observation of dendritic actin filament networks nucleated by Arp2/3 complex and WASP/Scar proteins. *Nature* *404*, 1007–1011.
- Blanchoin, L., Pollard, T.D., and Mullins, R.D. (2000b). Interactions of ADF/cofilin, Arp2/3 complex, capping protein and profilin in remodeling of branched actin filament networks. *Curr. Biol. CB* *10*, 1273–1282.
- Blanchoin, L., Pollard, T.D., and Hitchcock-DeGregori, S.E. (2001). Inhibition of the Arp2/3 complex-nucleated actin polymerization and branch formation by tropomyosin. *Curr. Biol. CB* *11*, 1300–1304.
- Blanchoin, L., Boujemaa-Paterski, R., Sykes, C., and Plastino, J. (2014). Actin dynamics, architecture, and mechanics in cell motility. *Physiol. Rev.* *94*, 235–263.
- Blum, R., and Konnerth, A. (2005). Neurotrophin-mediated rapid signaling in the central nervous system: mechanisms and functions. *Physiol. Bethesda Md* *20*, 70–78.
- Bondallaz, P., Barbier, A., Soehrman, S., Grenningloh, G., and Riederer, B.M. (2006). The control of microtubule stability in vitro and in transfected cells by MAP1B and SCG10. *Cell Motil. Cytoskeleton* *63*, 681–695.
- Bosc, C., Cronk, J.D., Pirollet, F., Watterson, D.M., Haiech, J., Job, D., and Margolis, R.L. (1996). Cloning, expression, and properties of the microtubule-stabilizing protein STOP. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* *93*, 2125–2130.
- Braak, H., and Braak, E. (1991). Neuropathological staging of Alzheimer-related changes. *Acta Neuropathol. (Berl.)* *82*, 239–259.
- Braak, H., and Del Tredici, K. (2004). Alzheimer's disease: intraneuronal alterations precede insoluble amyloid-beta formation. *Neurobiol. Aging* *25*, 713–718; discussion 743–746.
- Bradke, F., and Dotti, C.G. (1999). The role of local actin instability in axon formation. *Science* *283*, 1931–1934.
- Brandt, R., and Lee, G. (1993). Functional organization of microtubule-associated protein tau. Identification of regions which affect microtubule growth, nucleation, and bundle formation in vitro. *J. Biol. Chem.* *268*, 3414–3419.
- Brandt, R., and Lee, G. (1994). Orientation, assembly, and stability of microtubule bundles induced by a fragment of tau protein. *Cell Motil. Cytoskeleton* *28*, 143–154.
- Brandt, R., Léger, J., and Lee, G. (1995). Interaction of tau with the neural plasma membrane mediated by tau's amino-terminal projection domain. *J. Cell Biol.* *131*, 1327–1340.
- Brion, J.P., Couck, A.M., Passareiro, E., and Flament-Durand, J. (1985). Neurofibrillary tangles of Alzheimer's disease: an immunohistochemical study. *J. Submicrosc. Cytol.* *17*, 89–96.
- Brugg, B., and Matus, A. (1991). Phosphorylation determines the binding of microtubule-associated protein 2 (MAP2) to microtubules in living cells. *J. Cell Biol.* *114*, 735–743.
- Buée, L., Bussi re, T., Bu e-Scherrer, V., Delacourte, A., and Hof, P.R. (2000). Tau protein isoforms, phosphorylation and role in neurodegenerative disorders. *Brain Res. Brain Res. Rev.* *33*, 95–130.
- Buey, R.M., D  az, J.F., and Andreu, J.M. (2006). The nucleotide switch of tubulin and microtubule assembly: a polymerization-driven structural change. *Biochemistry (Mosc.)* *45*, 5933–5938.
- Bunker, J.M., Wilson, L., Jordan, M.A., and Feinstein, S.C. (2004). Modulation of microtubule dynamics by tau in living cells: implications for development and neurodegeneration. *Mol. Biol. Cell* *15*, 2720–2728.
- Burack, M.A., Silverman, M.A., and Banker, G. (2000). The role of selective transport in neuronal protein sorting. *Neuron* *26*, 465–472.
- Burridge, K., and Wittchen, E.S. (2013). The tension mounts: stress fibers as force-generating mechanotransducers. *J. Cell Biol.* *200*, 9–19.
- Busch, K.E., Hayles, J., Nurse, P., and Brunner, D. (2004). Tea2p kinesin is involved in spatial microtubule organization by transporting tip1p on microtubules. *Dev. Cell* *6*, 831–843.
- Butner, K.A., and Kirschner, M.W. (1991a). Tau Protein Binds to Microtubules through.
- Butner, K.A., and Kirschner, M.W. (1991b). Tau protein binds to microtubules through a flexible array of distributed weak sites. *J. Cell Biol.* *115*, 717–730.
- Caceres, A., and Kosik, K.S. (1990). Inhibition of neurite polarity by tau antisense oligonucleotides in primary cerebellar neurons. *Nature* *343*, 461–463.

- Caceres, A., Banker, G., Steward, O., Binder, L., and Payne, M. (1984). MAP2 is localized to the dendrites of hippocampal neurons which develop in culture. *Brain Res.* 315, 314–318.
- Caceres, A., Mautino, J., and Kosik, K.S. (1992). Suppression of MAP2 in cultured cerebellar macroneurons inhibits minor neurite formation. *Neuron* 9, 607–618.
- Caplow, M., Ruhlen, R.L., and Shanks, J. (1994). The free energy for hydrolysis of a microtubule-bound nucleotide triphosphate is near zero: all of the free energy for hydrolysis is stored in the microtubule lattice. *J. Cell Biol.* 127, 779–788.
- Carlier, M.F. (1991). Actin: protein structure and filament dynamics. *J. Biol. Chem.* 266, 1–4.
- Carlier, M.F. (1998). Control of actin dynamics. *Curr. Opin. Cell Biol.* 10, 45–51.
- Carlier, M.F., and Pantaloni, D. (1981). Kinetic analysis of guanosine 5'-triphosphate hydrolysis associated with tubulin polymerization. *Biochemistry (Mosc.)* 20, 1918–1924.
- Carlier, M.F., Laurent, V., Santolini, J., Melki, R., Didry, D., Xia, G.X., Hong, Y., Chua, N.H., and Pantaloni, D. (1997). Actin depolymerizing factor (ADF/cofilin) enhances the rate of filament turnover: implication in actin-based motility. *J. Cell Biol.* 136, 1307–1322.
- Carvalho, P., Tirnauer, J.S., and Pellman, D. (2003). Surfing on microtubule ends. *Trends Cell Biol.* 13, 229–237.
- Carvalho, P., Gupta, M.L., Hoyt, M.A., and Pellman, D. (2004). Cell cycle control of kinesin-mediated transport of Bik1 (CLIP-170) regulates microtubule stability and dynein activation. *Dev. Cell* 6, 815–829.
- Cassimeris, L. (2002). The oncoprotein 18/stathmin family of microtubule destabilizers. *Curr. Opin. Cell Biol.* 14, 18–24.
- Cassimeris, L., and Spittle, C. (2001). Regulation of microtubule-associated proteins. *Int. Rev. Cytol.* 210, 163–226.
- Caudron, N., Arnal, I., Buhler, E., Job, D., and Valiron, O. (2002). Microtubule nucleation from stable tubulin oligomers. *J. Biol. Chem.* 277, 50973–50979.
- Challacombe, J.F., and Elam, J.S. (1997). Chondroitin 4-sulfate stimulates regeneration of goldfish retinal axons. *Exp. Neurol.* 143, 10–17.
- Chan, C., Beltzner, C.C., and Pollard, T.D. (2009). Cofilin dissociates Arp2/3 complex and branches from actin filaments. *Curr. Biol. CB* 19, 537–545.
- Chapin, S.J., Bulinski, J.C., and Gundersen, G.G. (1991). Microtubule bundling in cells. *Nature* 349, 24.
- Chen, J., Kanai, Y., Cowan, N.J., and Hirokawa, N. (1992). Projection domains of MAP2 and tau determine spacings between microtubules in dendrites and axons. *Nature* 360, 674–677.
- Chesarone, M.A., DuPage, A.G., and Goode, B.L. (2010). Unleashing formins to remodel the actin and microtubule cytoskeletons. *Nat. Rev. Mol. Cell Biol.* 11, 62–74.
- Chhabra, E.S., and Higgs, H.N. (2007). The many faces of actin: matching assembly factors with cellular structures. *Nat. Cell Biol.* 9, 1110–1121.
- Chi, P., Greengard, P., and Ryan, T.A. (2001). Synapsin dispersion and reclustering during synaptic activity. *Nat. Neurosci.* 4, 1187–1193.
- Cho, J.-H., and Johnson, G.V.W. (2003). Glycogen synthase kinase 3 β phosphorylates tau at both primed and unprimed sites. Differential impact on microtubule binding. *J. Biol. Chem.* 278, 187–193.
- Chrétien, D., and Fuller, S.D. (2000). Microtubules switch occasionally into unfavorable configurations during elongation. *J. Mol. Biol.* 298, 663–676.
- Chrétien, D., and Wade, R.H. (1991). New data on the microtubule surface lattice. *Biol. Cell Auspices Eur. Cell Biol. Organ.* 71, 161–174.
- Chrétien, D., Metoz, F., Verde, F., Karsenti, E., and Wade, R.H. (1992). Lattice defects in microtubules: protofilament numbers vary within individual microtubules. *J. Cell Biol.* 117, 1031–1040.
- Chrétien, D., Fuller, S.D., and Karsenti, E. (1995). Structure of growing microtubule ends: two-dimensional sheets close into tubes at variable rates. *J. Cell Biol.* 129, 1311–1328.
- Chrétien, D., Jáinosi, I., Taveau, J.C., and Flyvbjerg, H. (1999). Microtubule's conformational cap. *Cell Struct. Funct.* 24, 299–303.
- Chun, W., and Johnson, G.V.W. (2007). The role of tau phosphorylation and cleavage in neuronal cell death. *Front. Biosci. J. Virtual Libr.* 12, 733–756.

- Chung, W.J., Kindler, S., Seidenbecher, C., and Garner, C.C. (1996). MAP2a, an alternatively spliced variant of microtubule-associated protein 2. *J. Neurochem.* *66*, 1273–1281.
- Cingolani, L.A., and Goda, Y. (2008). Actin in action: the interplay between the actin cytoskeleton and synaptic efficacy. *Nat. Rev. Neurosci.* *9*, 344–356.
- Cleveland, D.O.N.W., Hwo, S., and Kirschner, M.W. (1977a). Purification of Tau , a Microtubule-associated Protein that Induces Assembly of Microtubules from Purified Tubulin. 207–225.
- Cleveland, D.W., Hwo, S.Y., and Kirschner, M.W. (1977b). Physical and chemical properties of purified tau factor and the role of tau in microtubule assembly. *J. Mol. Biol.* *116*, 227–247.
- Cole, N.B., and Lippincott-Schwartz, J. (1995). Organization of organelles and membrane traffic by microtubules. *Curr. Opin. Cell Biol.* *7*, 55–64.
- Comer, F.I., and Hart, G.W. (2000). O-Glycosylation of nuclear and cytosolic proteins. Dynamic interplay between O-GlcNAc and O-phosphate. *J. Biol. Chem.* *275*, 29179–29182.
- Conde, C., and Cáceres, A. (2009). Microtubule assembly, organization and dynamics in axons and dendrites. *Nat. Rev. Neurosci.* *10*, 319–332.
- Cook, T.A., Nagasaki, T., and Gundersen, G.G. (1998). Rho guanosine triphosphatase mediates the selective stabilization of microtubules induced by lysophosphatidic acid. *J. Cell Biol.* *141*, 175–185.
- Correas, I., Padilla, R., and Avila, J. (1990). The tubulin-binding sequence of brain microtubule-associated proteins, tau and MAP-2, is also involved in actin binding. *Biochem. J.* *269*, 61–64.
- Courson, D.S., and Rock, R.S. (2010). Actin cross-link assembly and disassembly mechanics for alpha-Actinin and fascin. *J. Biol. Chem.* *285*, 26350–26357.
- Cowan, C.M., Bossing, T., Page, A., Shepherd, D., and Mudher, A. (2010). Soluble hyperphosphorylated tau causes microtubule breakdown and functionally compromises normal tau in vivo. *Acta Neuropathol. (Berl.)* *120*, 593–604.
- Cryns, V.L., Byun, Y., Rana, A., Mellor, H., Lustig, K.D., Ghanem, L., Parker, P.J., Kirschner, M.W., and Yuan, J. (1997). Specific proteolysis of the kinase protein kinase C-related kinase 2 by caspase-3 during apoptosis. Identification by a novel, small pool expression cloning strategy. *J. Biol. Chem.* *272*, 29449–29453.
- Cunningham, C.C., Leclerc, N., Flanagan, L.A., Lu, M., Janmey, P.A., and Kosik, K.S. (1997). Microtubule-associated protein 2c reorganizes both microtubules and microfilaments into distinct cytological structures in an actin-binding protein-280-deficient melanoma cell line. *J. Cell Biol.* *136*, 845–857.
- Van Damme, D., Van Poucke, K., Boutant, E., Ritzenthaler, C., Inzé, D., and Geelen, D. (2004). In vivo dynamics and differential microtubule-binding activities of MAP65 proteins. *Plant Physiol.* *136*, 3956–3967.
- Daub, H., Gevaert, K., Vandekerckhove, J., Sobel, A., and Hall, A. (2001). Rac/Cdc42 and p65PAK regulate the microtubule-destabilizing protein stathmin through phosphorylation at serine 16. *J. Biol. Chem.* *276*, 1677–1680.
- David-Pfeuty, T., Erickson, H.P., and Pantaloni, D. (1977). Guanosinetriphosphatase activity of tubulin associated with microtubule assembly. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* *74*, 5372–5376.
- Dawson, H.N., Ferreira, A., Eyster, M.V., Ghoshal, N., Binder, L.I., and Vitek, M.P. (2001). Inhibition of neuronal maturation in primary hippocampal neurons from tau deficient mice. *J. Cell Sci.* *114*, 1179–1187.
- Dehmelt, L., and Halpain, S. (2004). Actin and microtubules in neurite initiation: are MAPs the missing link? *J. Neurobiol.* *58*, 18–33.
- Dehmelt, L., and Halpain, S. (2005). The MAP2/Tau family of microtubule-associated proteins. *Genome Biol.* *6*, 204.
- Delacourte, A., and Buée, L. (2000). Tau pathology: a marker of neurodegenerative disorders. *Curr. Opin. Neurol.* *13*, 371–376.
- Delacourte, A., David, J.P., Sergeant, N., Buée, L., Wattez, A., Vermersch, P., Ghazali, F., Fallet-Bianco, C., Pasquier, F., Lebert, F., et al. (1999). The biochemical pathway of neurofibrillary degeneration in aging and Alzheimer's disease. *Neurology* *52*, 1158–1165.
- Delacourte, A., Sergeant, N., Champain, D., Wattez, A., Maurice, C.-A., Lebert, F., Pasquier, F., and David, J.-P. (2002). Nonoverlapping but synergetic tau and APP pathologies in sporadic Alzheimer's disease. *Neurology* *59*, 398–407.

- Dent, E.W., and Baas, P.W. (2014). Microtubules in neurons as information carriers. *J. Neurochem.* 129, 235–239.
- Dent, E.W., and Gertler, F.B. (2003). Cytoskeletal dynamics and transport in growth cone motility and axon guidance. *Neuron* 40, 209–227.
- Dent, E.W., and Kalil, K. (2001). Axon branching requires interactions between dynamic microtubules and actin filaments. *J. Neurosci. Off. J. Soc. Neurosci.* 21, 9757–9769.
- Dent, E.W., Callaway, J.L., Szebenyi, G., Baas, P.W., and Kalil, K. (1999). Reorganization and movement of microtubules in axonal growth cones and developing interstitial branches. *J. Neurosci. Off. J. Soc. Neurosci.* 19, 8894–8908.
- Dent, E.W., Merriam, E.B., and Hu, X. (2011). The dynamic cytoskeleton: backbone of dendritic spine plasticity. *Curr. Opin. Neurobiol.* 21, 175–181.
- Derisbourg, M., Leghay, C., Chiappetta, G., Fernandez-Gomez, F.-J., Laurent, C., Demeyer, D., Carrier, S., Buée-Scherrer, V., Blum, D., Vinh, J., et al. (2015). Role of the Tau N-terminal region in microtubule stabilization revealed by new endogenous truncated forms. *Sci. Rep.* 5, 9659.
- Devred, F., Barbier, P., Douillard, S., Monasterio, O., Andreu, J.M., and Peyrot, V. (2004). Tau induces ring and microtubule formation from alphabeta-tubulin dimers under nonassembly conditions. *Biochemistry (Mosc.)* 43, 10520–10531.
- Diamantopoulos, G.S., Perez, F., Goodson, H.V., Batelier, G., Melki, R., Kreis, T.E., and Rickard, J.E. (1999). Dynamic localization of CLIP-170 to microtubule plus ends is coupled to microtubule assembly. *J. Cell Biol.* 144, 99–112.
- DiBella, L.M., Benashski, S.E., Tedford, H.W., Harrison, A., Patel-King, R.S., and King, S.M. (2001). The Tctex1/Tctex2 class of dynein light chains. Dimerization, differential expression, and interaction with the LC8 protein family. *J. Biol. Chem.* 276, 14366–14373.
- Dickson, D.W., Kouri, N., Murray, M.E., and Josephs, K.A. (2011). Neuropathology of frontotemporal lobar degeneration-tau (FTLD-tau). *J. Mol. Neurosci. MN* 45, 384–389.
- Dillman, J.F., Dabney, L.P., and Pfister, K.K. (1996). Cytoplasmic dynein is associated with slow axonal transport. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* 93, 141–144.
- Dillon, C., and Goda, Y. (2005). The actin cytoskeleton: integrating form and function at the synapse. *Annu. Rev. Neurosci.* 28, 25–55.
- Dimitrov, A., Quesnoit, M., Moutel, S., Cantaloube, I., Poüs, C., and Perez, F. (2008). Detection of GTP-tubulin conformation in vivo reveals a role for GTP remnants in microtubule rescues. *Science* 322, 1353–1356.
- Dixit, R., Ross, J.L., Goldman, Y.E., and Holzbaur, E.L.F. (2008). Differential regulation of dynein and kinesin motor proteins by tau. *Science* 319, 1086–1089.
- Doll, T., Meichsner, M., Riederer, B.M., Honegger, P., and Matus, A. (1993). An isoform of microtubule-associated protein 2 (MAP2) containing four repeats of the tubulin-binding motif. *J. Cell Sci.* 106 (Pt 2), 633–639.
- Drechsel, D.N., Hyman, A.A., Cobb, M.H., and Kirschner, M.W. (1992). Modulation of the Dynamic Instability of Tubulin Assembly by the Microtubule-Associated Protein Tau. 3, 1141–1154.
- Drewes, G., Trinczek, B., Illenberger, S., Biernat, J., Schmitt-Ulms, G., Meyer, H.E., Mandelkow, E.M., and Mandelkow, E. (1995). Microtubule-associated protein/microtubule affinity-regulating kinase (p110mark). A novel protein kinase that regulates tau-microtubule interactions and dynamic instability by phosphorylation at the Alzheimer-specific site serine 262. *J. Biol. Chem.* 270, 7679–7688.
- Drewes, G., Ebner, A., Preuss, U., Mandelkow, E.M., and Mandelkow, E. (1997). MARK, a novel family of protein kinases that phosphorylate microtubule-associated proteins and trigger microtubule disruption. *Cell* 89, 297–308.
- Drubin, D.G., and Kirschner, M.W. (1986). Tau protein function in living cells. *J. Cell Biol.* 103, 2739–2746.
- Dudek, S.M., and Johnson, G.V. (1993). Transglutaminase catalyzes the formation of sodium dodecyl sulfate-insoluble, Alz-50-reactive polymers of tau. *J. Neurochem.* 61, 1159–1162.
- Dujardin, S., Lécolle, K., Caillierez, R., Bégard, S., Zommer, N., Lachaud, C., Carrier, S., Dufour, N., Aurégan, G., Winderickx, J., et al. (2014). Neuron-to-neuron wild-type Tau protein transfer through a trans-synaptic mechanism: relevance to sporadic tauopathies. *Acta Neuropathol. Commun.* 2, 14.

- Ebneth, A., Godemann, R., Stamer, K., Illenberger, S., Trinczek, B., and Mandelkow, E. (1998). Overexpression of tau protein inhibits kinesin-dependent trafficking of vesicles, mitochondria, and endoplasmic reticulum: implications for Alzheimer's disease. *J. Cell Biol.* *143*, 777–794.
- Edelmann, W., Zervas, M., Costello, P., Roback, L., Fischer, I., Hammarback, J.A., Cowan, N., Davies, P., Wainer, B., and Kucherlapati, R. (1996). Neuronal abnormalities in microtubule-associated protein 1B mutant mice. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* *93*, 1270–1275.
- Eliezer, D., Barré, P., Kobaslija, M., Chan, D., Li, X., and Heend, L. (2005). Residual structure in the repeat domain of tau: echoes of microtubule binding and paired helical filament formation. *Biochemistry (Mosc.)* *44*, 1026–1036.
- Eng, H., Lund, K., and Campenot, R.B. (1999). Synthesis of beta-tubulin, actin, and other proteins in axons of sympathetic neurons in compartmented cultures. *J. Neurosci. Off. J. Soc. Neurosci.* *19*, 1–9.
- Etienne-Manneville, S., and Hall, A. (2002). Rho GTPases in cell biology. *Nature* *420*, 629–635.
- Evans, L., Mitchison, T., and Kirschner, M. (1985). Influence of the centrosome on the structure of nucleated microtubules. *J. Cell Biol.* *100*, 1185–1191.
- Fan, J., Griffiths, A.D., Lockhart, A., Cross, R.A., and Amos, L.A. (1996). Microtubule minus ends can be labelled with a phage display antibody specific to alpha-tubulin. *J. Mol. Biol.* *259*, 325–330.
- Farias, G.A., Muñoz, J.P., Garrido, J., and Maccioni, R.B. (2002). Tubulin, actin, and tau protein interactions and the study of their macromolecular assemblies. *J. Cell. Biochem.* *85*, 315–324.
- Fasulo, L., Ugolini, G., and Cattaneo, A. (2005). Apoptotic effect of caspase-3 cleaved tau in hippocampal neurons and its potentiation by tau FTDP-mutation N279K. *J. Alzheimers Dis. JAD* *7*, 3–13.
- Fauquant, C., Redeker, V., Landrieu, I., Wieruszeski, J.-M., Verdegem, D., Laprévote, O., Lippens, G., Gigant, B., and Knossow, M. (2011). Systematic identification of tubulin-interacting fragments of the microtubule-associated protein Tau leads to a highly efficient promoter of microtubule assembly. *J. Biol. Chem.* *286*, 33358–33368.
- Ferhat, L., Represa, A., Bernard, A., Ben-Ari, Y., and Khrestchatisky, M. (1996). MAP2d promotes bundling and stabilization of both microtubules and microfilaments. *J. Cell Sci.* *109 (Pt 5)*, 1095–1103.
- Ferreira, A., and Bigio, E.H. (2011). Calpain-mediated tau cleavage: a mechanism leading to neurodegeneration shared by multiple tauopathies. *Mol. Med. Camb. Mass* *17*, 676–685.
- Feuillet, S., Miguel, L., Frébourg, T., Campion, D., and Lecourtis, M. (2010). Drosophila models of human tauopathies indicate that Tau protein toxicity in vivo is mediated by soluble cytosolic phosphorylated forms of the protein. *J. Neurochem.* *113*, 895–903.
- Fischer, M., Kaech, S., Knutti, D., and Matus, A. (1998). Rapid actin-based plasticity in dendritic spines. *Neuron* *20*, 847–854.
- Flunkert, S., Hierzer, M., Löffler, T., Rabl, R., Neddens, J., Duller, S., Schofield, E.L., Ward, M.A., Posch, M., Jungwirth, H., et al. (2013). Elevated levels of soluble total and hyperphosphorylated tau result in early behavioral deficits and distinct changes in brain pathology in a new tau transgenic mouse model. *Neurodegener. Dis.* *11*, 194–205.
- Flyvbjerg, H., Jobs, E., and Leibler, S. (1996). Kinetics of self-assembling microtubules: an “inverse problem” in biochemistry. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* *93*, 5975–5979.
- Francis, F., Koulakoff, A., Boucher, D., Chafey, P., Schaar, B., Vinet, M.C., Friocourt, G., McDonnell, N., Reiner, O., Kahn, A., et al. (1999). Doublecortin is a developmentally regulated, microtubule-associated protein expressed in migrating and differentiating neurons. *Neuron* *23*, 247–256.
- Frandemich, M.L., De Seranno, S., Rush, T., Borel, E., Elie, A., Arnal, I., Lanté, F., and Buisson, A. (2014). Activity-dependent tau protein translocation to excitatory synapse is disrupted by exposure to amyloid-beta oligomers. *J. Neurosci. Off. J. Soc. Neurosci.* *34*, 6084–6097.
- Frankle, W.G., Lerma, J., and Laruelle, M. (2003). The synaptic hypothesis of schizophrenia. *Neuron* *39*, 205–216.
- Frappier, T.F., Georgieff, I.S., Brown, K., and Shelanski, M.L. (1994). tau Regulation of microtubule-microtubule spacing and bundling. *J. Neurochem.* *63*, 2288–2294.

- Friocourt, G., Koulakoff, A., Chafey, P., Boucher, D., Fauchereau, F., Chelly, J., and Francis, F. (2003). Doublecortin functions at the extremities of growing neuronal processes. *Cereb. Cortex N. Y. N* 1991 *13*, 620–626.
- Fukata, M., Watanabe, T., Noritake, J., Nakagawa, M., Yamaga, M., Kuroda, S., Matsuura, Y., Iwamatsu, A., Perez, F., and Kaibuchi, K. (2002). Rac1 and Cdc42 capture microtubules through IQGAP1 and CLIP-170. *Cell* *109*, 873–885.
- Fukata, M., Nakagawa, M., and Kaibuchi, K. (2003). Roles of Rho-family GTPases in cell polarisation and directional migration. *Curr. Opin. Cell Biol.* *15*, 590–597.
- Fulga, T. a, Elson-Schwab, I., Khurana, V., Steinhilb, M.L., Spires, T.L., Hyman, B.T., and Feany, M.B. (2007). Abnormal bundling and accumulation of F-actin mediates tau-induced neuronal degeneration in vivo. *Nat. Cell Biol.* *9*, 139–148.
- Gadde, S., and Heald, R. (2004). Mechanisms and molecules of the mitotic spindle. *Curr. Biol. CB* *14*, R797–R805.
- Gaillard, J., Neumann, E., Van Damme, D., Stoppin-Mellet, V., Ebel, C., Barbier, E., Geelen, D., and Vantard, M. (2008). Two microtubule-associated proteins of Arabidopsis MAP65s promote antiparallel microtubule bundling. *Mol. Biol. Cell* *19*, 4534–4544.
- Galjart, N. (2010). Plus-end-tracking proteins and their interactions at microtubule ends. *Curr. Biol. CB* *20*, R528–R537.
- Gamblin, T.C., Chen, F., Zambrano, A., Abraha, A., Lagalwar, S., Guillozet, A.L., Lu, M., Fu, Y., Garcia-Sierra, F., LaPointe, N., et al. (2003). Caspase cleavage of tau: linking amyloid and neurofibrillary tangles in Alzheimer's disease. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* *100*, 10032–10037.
- Gandhi, M., Smith, B.A., Bovellan, M., Paavilainen, V., Daugherty-Clarke, K., Gelles, J., Lappalainen, P., and Goode, B.L. (2010). GMF is a cofilin homolog that binds Arp2/3 complex to stimulate filament debranching and inhibit actin nucleation. *Curr. Biol. CB* *20*, 861–867.
- Ganguly, P., Do, T.D., Larini, L., LaPointe, N.E., Sercel, A.J., Shade, M.F., Feinstein, S.C., Bowers, M.T., and Shea, J.-E. (2015). Tau assembly: the dominant role of PHF6 (VQIVYK) in microtubule binding region repeat R3. *J. Phys. Chem. B* *119*, 4582–4593.
- Garner, C.C., and Matus, A. (1988). Different forms of microtubule-associated protein 2 are encoded by separate mRNA transcripts. *J. Cell Biol.* *106*, 779–783.
- Gebremichael, Y., Chu, J.-W., and Voth, G.A. (2008). Intrinsic bending and structural rearrangement of tubulin dimer: molecular dynamics simulations and coarse-grained analysis. *Biophys. J.* *95*, 2487–2499.
- Gendron, T.F., and Petrucelli, L. (2009). The role of tau in neurodegeneration. *Mol. Neurodegener.* *4*, 13.
- Georgieff, I.S., Liem, R.K., Couchie, D., Mavilia, C., Nunez, J., and Shelanski, M.L. (1993). Expression of high molecular weight tau in the central and peripheral nervous systems. *J. Cell Sci.* *105 (Pt 3)*, 729–737.
- Geraldo, S., and Gordon-Weeks, P.R. (2009). Cytoskeletal dynamics in growth-cone steering. *J. Cell Sci.* *122*, 3595–3604.
- Geraldo, S., Khanzada, U.K., Parsons, M., Chilton, J.K., and Gordon-Weeks, P.R. (2008). Targeting of the F-actin-binding protein drebrin by the microtubule plus-tip protein EB3 is required for neuritogenesis. *Nat. Cell Biol.* *10*, 1181–1189.
- Gigant, B., Wang, C., Ravelli, R.B.G., Roussi, F., Steinmetz, M.O., Curmi, P.A., Sobel, A., and Knossow, M. (2005). Structural basis for the regulation of tubulin by vinblastine. *Nature* *435*, 519–522.
- Gigant, B., Landrieu, I., Fauquant, C., Barbier, P., Huvent, I., Wieruszeski, J.-M., Knossow, M., and Lippens, G. (2014). Mechanism of Tau-promoted microtubule assembly as probed by NMR spectroscopy. *J. Am. Chem. Soc.* *136*, 12615–12623.
- Goedert, M., and Jakes, R. (1990). Expression of separate isoforms of human tau protein: correlation with the tau pattern in brain and effects on tubulin polymerization. *EMBO J.* *9*, 4225–4230.
- Goedert, M., Spillantini, M.G., Potier, M.C., Ulrich, J., and Crowther, R.A. (1989). Cloning and sequencing of the cDNA encoding an isoform of microtubule-associated protein tau containing four tandem repeats: differential expression of tau protein mRNAs in human brain. *EMBO J.* *8*, 393–399.

- Goldberg, D.J., and Burmeister, D.W. (1986). Stages in axon formation: observations of growth of Aplysia axons in culture using video-enhanced contrast-differential interference contrast microscopy. *J. Cell Biol.* 103, 1921–1931.
- Gong, C.X., Shaikh, S., Wang, J.Z., Zaidi, T., Grundke-Iqbal, I., and Iqbal, K. (1995). Phosphatase activity toward abnormally phosphorylated tau: decrease in Alzheimer disease brain. *J. Neurochem.* 65, 732–738.
- González-Billault, C., Demandt, E., Wandosell, F., Torres, M., Bonaldo, P., Stoykova, A., Chowdhury, K., Gruss, P., Avila, J., and Sánchez, M.P. (2000). Perinatal lethality of microtubule-associated protein 1B-deficient mice expressing alternative isoforms of the protein at low levels. *Mol. Cell. Neurosci.* 16, 408–421.
- Goode, B.L., and Feinstein, S.C. (1994). Identification of a novel microtubule binding and assembly domain in the developmentally regulated inter-repeat region of tau. *J. Cell Biol.* 124, 769–782.
- Goode, B.L., Denis, P.E., Panda, D., Radeke, M.J., Miller, H.P., Wilson, L., and Feinstein, S.C. (1997). Functional interactions between the proline-rich and repeat regions of tau enhance microtubule binding and assembly. *Mol. Biol. Cell* 8, 353–365.
- Goode, B.L., Chau, M., Denis, P.E., and Feinstein, S.C. (2000). Structural and functional differences between 3-repeat and 4-repeat tau isoforms. Implications for normal tau function and the onset of neurodegenerative disease. *J. Biol. Chem.* 275, 38182–38189.
- Goold, R.G., Owen, R., and Gordon-Weeks, P.R. (1999). Glycogen synthase kinase 3 β phosphorylation of microtubule-associated protein 1B regulates the stability of microtubules in growth cones. *J. Cell Sci.* 112 (Pt 19), 3373–3384.
- Gordon-Weeks, P.R. (1991). Evidence for microtubule capture by filopodial actin filaments in growth cones. *Neuroreport* 2, 573–576.
- Gordon-Weeks, P.R. (2004). Microtubules and growth cone function. *J. Neurobiol.* 58, 70–83.
- Gordon-Weeks, P.R., and Fournier, A.E. (2014). Neuronal cytoskeleton in synaptic plasticity and regeneration. *J. Neurochem.* 129, 206–212.
- Goshima, G. (2006). [Roles of kinesins in mitosis]. *Tanpakushitsu Kakusan Koso.* 51, 579–585.
- Goshima, G., and Scholey, J.M. (2010). Control of mitotic spindle length. *Annu. Rev. Cell Dev. Biol.* 26, 21–57.
- Greenberg, S.G., and Davies, P. (1990). A preparation of Alzheimer paired helical filaments that displays distinct tau proteins by polyacrylamide gel electrophoresis. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* 87, 5827–5831.
- Greengard, P., Benfenati, F., and Valtorta, F. (1994). Synapsin I, an actin-binding protein regulating synaptic vesicle traffic in the nerve terminal. *Adv. Second Messenger Phosphoprotein Res.* 29, 31–45.
- Griffiths, L.M., and Pollards, D. (1982). The Interaction of Actin Filaments with Microtubules and Microtubule-associated Proteins *. 257, 9143–9151.
- Grundke-Iqbal, I., Iqbal, K., Tung, Y.C., Quinlan, M., Wisniewski, H.M., and Binder, L.I. (1986). Abnormal phosphorylation of the microtubule-associated protein tau (tau) in Alzheimer cytoskeletal pathology. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* 83, 4913–4917.
- Gu, J., Firestein, B.L., and Zheng, J.Q. (2008). Microtubules in dendritic spine development. *J. Neurosci. Off. J. Soc. Neurosci.* 28, 12120–12124.
- Gu, Y., Oyama, F., and Ihara, Y. (1996). Tau is widely expressed in rat tissues. *J. Neurochem.* 67, 1235–1244.
- Guillaud, L., Bosc, C., Fourest-Lieuvin, A., Denarier, E., Pirollet, F., Lafanechère, L., and Job, D. (1998). STOP proteins are responsible for the high degree of microtubule stabilization observed in neuronal cells. *J. Cell Biol.* 142, 167–179.
- Guillozet-Bongaarts, A.L., Garcia-Sierra, F., Reynolds, M.R., Horowitz, P.M., Fu, Y., Wang, T., Cahill, M.E., Bigio, E.H., Berry, R.W., and Binder, L.I. (2005). Tau truncation during neurofibrillary tangle evolution in Alzheimer's disease. *Neurobiol. Aging* 26, 1015–1022.
- Guillozet-Bongaarts, A.L., Glajch, K.E., Libson, E.G., Cahill, M.E., Bigio, E., Berry, R.W., and Binder, L.I. (2007). Phosphorylation and cleavage of tau in non-AD tauopathies. *Acta Neuropathol. (Berl.)* 113, 513–520.
- Gundersen, G.G. (2002). Evolutionary conservation of microtubule-capture mechanisms. *Nat. Rev. Mol. Cell Biol.* 3, 296–304.

- Guo, H., Albrecht, S., Bourdeau, M., Petzke, T., Bergeron, C., and LeBlanc, A.C. (2004). Active caspase-6 and caspase-6-cleaved tau in neuropil threads, neuritic plaques, and neurofibrillary tangles of Alzheimer's disease. *Am. J. Pathol.* 165, 523–531.
- Gustke, N., Steiner, B., Mandelkow, E.M., Biernat, J., Meyer, H.E., Goedert, M., and Mandelkow, E. (1992). The Alzheimer-like phosphorylation of tau protein reduces microtubule binding and involves Ser-Pro and Thr-Pro motifs. *FEBS Lett.* 307, 199–205.
- Gustke, N., Trinczek, B., Biernat, J., Mandelkow, E.M., and Mandelkow, E. (1994). Domains of tau protein and interactions with microtubules. *Biochemistry (Mosc.)* 33, 9511–9522.
- Halpain, S., Spencer, K., and Graber, S. (2005). Dynamics and pathology of dendritic spines. *Prog. Brain Res.* 147, 29–37.
- Hammond, J.W., Cai, D., and Verhey, K.J. (2008). Tubulin modifications and their cellular functions. *Curr. Opin. Cell Biol.* 20, 71–76.
- Hanger, D.P., Seereeram, A., and Noble, W. (2009). Mediators of tau phosphorylation in the pathogenesis of Alzheimer's disease. *Expert Rev. Neurother.* 9, 1647–1666.
- Harada, A., Oguchi, K., Okabe, S., Kuno, J., Terada, S., Ohshima, T., Sato-Yoshitake, R., Takei, Y., Noda, T., and Hirokawa, N. (1994). Altered microtubule organization in small-calibre axons of mice lacking tau protein. *Nature* 369, 488–491.
- van Haren, J., Draegestein, K., Keijzer, N., Abrahams, J.P., Grosveld, F., Peeters, P.J., Moechars, D., and Galjart, N. (2009). Mammalian Navigators are microtubule plus-end tracking proteins that can reorganize the cytoskeleton to induce neurite-like extensions. *Cell Motil. Cytoskeleton* 66, 824–838.
- van Haren, J., Boudeau, J., Schmidt, S., Basu, S., Liu, Z., Lammers, D., Demmers, J., Benhari, J., Grosveld, F., Debant, A., et al. (2014). Dynamic microtubules catalyze formation of navigator-TRIO complexes to regulate neurite extension. *Curr. Biol. CB* 24, 1778–1785.
- He, H.J., Wang, X.S., Pan, R., Wang, D.L., Liu, M.N., and He, R.Q. (2009). The proline-rich domain of tau plays a role in interactions with actin. *BMC Cell Biol.* 10, 81.
- Hicks, J.L., Deng, W.M., Rogat, A.D., Miller, K.G., and Bownes, M. (1999). Class VI unconventional myosin is required for spermatogenesis in *Drosophila*. *Mol. Biol. Cell* 10, 4341–4353.
- Higashida, C., Miyoshi, T., Fujita, A., Ocegüera-Yanez, F., Monypenny, J., Andou, Y., Narumiya, S., and Watanabe, N. (2004). Actin polymerization-driven molecular movement of mDial in living cells. *Science* 303, 2007–2010.
- Himmler, A., Drechsel, D., Kirschner, M.W., and Martin, D.W. (1989). Tau consists of a set of proteins with repeated C-terminal microtubule-binding domains and variable N-terminal domains. *Mol. Cell. Biol.* 9, 1381–1388.
- Hirokawa, N. (1998). Kinesin and dynein superfamily proteins and the mechanism of organelle transport. *Science* 279, 519–526.
- Hirokawa, N., Shiomura, Y., and Okabe, S. (1988). Tau proteins: the molecular structure and mode of binding on microtubules. *J. Cell Biol.* 107, 1449–1459.
- Hirokawa, N., Sato-Yoshitake, R., Kobayashi, N., Pfister, K.K., Bloom, G.S., and Brady, S.T. (1991). Kinesin associates with anterogradely transported membranous organelles in vivo. *J. Cell Biol.* 114, 295–302.
- Hirokawa, N., Niwa, S., and Tanaka, Y. (2010). Molecular motors in neurons: transport mechanisms and roles in brain function, development, and disease. *Neuron* 68, 610–638.
- Hirose, K., Fan, J., and Amos, L.A. (1995). Re-examination of the polarity of microtubules and sheets decorated with kinesin motor domain. *J. Mol. Biol.* 251, 329–333.
- Holmes, K.C., Popp, D., Gebhard, W., and Kabsch, W. (1990). Atomic model of the actin filament. *Nature* 347, 44–49.
- Höög, J.L., Schwartz, C., Noon, A.T., O'Toole, E.T., Mastronarde, D.N., McIntosh, J.R., and Antony, C. (2007). Organization of interphase microtubules in fission yeast analyzed by electron tomography. *Dev. Cell* 12, 349–361.
- Hoogenraad, C.C., and Akhmanova, A. (2010). Dendritic spine plasticity: new regulatory roles of dynamic microtubules. *Neurosci. Rev. J. Bringing Neurobiol. Neurol. Psychiatry* 16, 650–661.
- Horio, T., and Hotani, H. (1986). Visualization of the dynamic instability of individual microtubules by dark-field microscopy. *Nature* 321, 605–607.

- Hotta, A., Kawakatsu, T., Nakatani, T., Sato, T., Matsui, C., Sukezane, T., Akagi, T., Hamaji, T., Grigoriev, I., Akhmanova, A., et al. (2010). Laminin-based cell adhesion anchors microtubule plus ends to the epithelial cell basal cortex through LL5alpha/beta. *J. Cell Biol.* 189, 901–917.
- Hotulainen, P., and Lappalainen, P. (2006). Stress fibers are generated by two distinct actin assembly mechanisms in motile cells. *J. Cell Biol.* 173, 383–394.
- Howell, B., Larsson, N., Gullberg, M., and Cassimeris, L. (1999). Dissociation of the tubulin-sequestering and microtubule catastrophe-promoting activities of oncoprotein 18/stathmin. *Mol. Biol. Cell* 10, 105–118.
- Hu, X., Viesselmann, C., Nam, S., Merriam, E., and Dent, E.W. (2008). Activity-Dependent Dynamic Microtubule Invasion of Dendritic Spines. *J. Neurosci.* 28, 13094–13105.
- Hua, Q., He, R.Q., Haque, N., Qu, M.H., del Carmen Alonso, A., Grundke-Iqbal, I., and Iqbal, K. (2003). Microtubule associated protein tau binds to double-stranded but not single-stranded DNA. *Cell. Mol. Life Sci. CMLS* 60, 413–421.
- Huang, J.D., Brady, S.T., Richards, B.W., Stenolen, D., Resau, J.H., Copeland, N.G., and Jenkins, N.A. (1999). Direct interaction of microtubule- and actin-based transport motors. *Nature* 397, 267–270.
- Hunyadi, V., Chrétien, D., and Jánosi, I.M. (2005). Mechanical stress induced mechanism of microtubule catastrophes. *J. Mol. Biol.* 348, 927–938.
- Hussey, P.J., Hawkins, T.J., Igarashi, H., Kaloriti, D., and Smertenko, A. (2002). The plant cytoskeleton: recent advances in the study of the plant microtubule-associated proteins MAP-65, MAP-190 and the *Xenopus* MAP215-like protein, MOR1. *Plant Mol. Biol.* 50, 915–924.
- Hutton, M., Lewis, J., Dickson, D., Yen, S.H., and McGowan, E. (2001). Analysis of tauopathies with transgenic mice. *Trends Mol. Med.* 7, 467–470.
- Hyman, A.A., Salser, S., Drechsel, D.N., Unwin, N., and Mitchison, T.J. (1992). Role of GTP hydrolysis in microtubule dynamics: information from a slowly hydrolyzable analogue, GMPCPP. *Mol. Biol. Cell* 3, 1155–1167.
- Hyman, A.A., Chrétien, D., Arnal, I., and Wade, R.H. (1995). Structural changes accompanying GTP hydrolysis in microtubules: information from a slowly hydrolyzable analogue guanylyl-(alpha,beta)-methylene-diphosphonate. *J. Cell Biol.* 128, 117–125.
- Ichihara, K., Kitazawa, H., Iguchi, Y., Hotani, H., and Itoh, T.J. (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.
- Ihara, Y., Nukina, N., Miura, R., and Ogawara, M. (1986). Phosphorylated tau protein is integrated into paired helical filaments in Alzheimer's disease. *J. Biochem. (Tokyo)* 99, 1807–1810.
- Iqbal, K., and Grundke-Iqbal, I. (1991). Ubiquitination and abnormal phosphorylation of paired helical filaments in Alzheimer's disease. *Mol. Neurobiol.* 5, 399–410.
- Ishikawa, M., Murofushi, H., and Sakai, H. (1983). Bundling of microtubules in vitro by fodrin. *J. Biochem. (Tokyo)* 94, 1209–1217.
- Ishikawa, R., Kagami, O., Hayashi, C., and Kohama, K. (1992a). The binding of nonmuscle caldesmon from brain to microtubules. Regulations by Ca(2+)-calmodulin and cdc2 kinase. *FEBS Lett.* 299, 54–56.
- Ishikawa, R., Kagami, O., Hayashi, C., and Kohama, K. (1992b). Characterization of smooth muscle caldesmon as a microtubule-associated protein. *Cell Motil. Cytoskeleton* 23, 244–251.
- Ittner, L.M., Ke, Y.D., Delerue, F., Bi, M., Gladbach, A., van Eersel, J., Wölfling, H., Chieng, B.C., Christie, M.J., Napier, I. a, et al. (2010). Dendritic function of tau mediates amyloid-beta toxicity in Alzheimer's disease mouse models. *Cell* 142, 387–397.
- Janke, C., and Bulinski, J.C. (2011). Post-translational regulation of the microtubule cytoskeleton: mechanisms and functions. *Nat. Rev. Mol. Cell Biol.* 12, 773–786.
- Jánosi, I.M., Chrétien, D., and Flyvbjerg, H. (1998). Modeling elastic properties of microtubule tips and walls. *Eur. Biophys. J. EBJ* 27, 501–513.
- Jaworski, J., Hoogenraad, C.C., and Akhmanova, A. (2008). Microtubule plus-end tracking proteins in differentiated mammalian cells. *Int. J. Biochem. Cell Biol.* 40, 619–637.
- Jaworski, J., Kapitein, L.C., Gouveia, S.M., Dortland, B.R., Wulf, P.S., Grigoriev, I., Camera, P., Spangler, S. a, Di Stefano, P., Demmers, J., et al. (2009). Dynamic microtubules regulate dendritic spine morphology and synaptic plasticity. *Neuron* 61, 85–100.

- Jeganathan, S., von Bergen, M., Bruchl, H., Steinhoff, H.-J., and Mandelkow, E. (2006). Global hairpin folding of tau in solution. *Biochemistry (Mosc.)* 45, 2283–2293.
- Job, D., Valiron, O., and Oakley, B. (2003). Microtubule nucleation. *Curr. Opin. Cell Biol.* 15, 111–117.
- Kabir, N., Schaefer, A.W., Nakhost, A., Sossin, W.S., and Forscher, P. (2001). Protein kinase C activation promotes microtubule advance in neuronal growth cones by increasing average microtubule growth lifetimes. *J. Cell Biol.* 152, 1033–1044.
- Kadavath, H., Hofele, R.V., Biernat, J., Kumar, S., Tepper, K., Urlaub, H., Mandelkow, E., and Zweckstetter, M. (2015a). Tau stabilizes microtubules by binding at the interface between tubulin heterodimers. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* 112, 7501–7506.
- Kadavath, H., Jaremko, M., Jaremko, L., Biernat, J., Mandelkow, E., and Zweckstetter, M. (2015b). Folding of the Tau Protein on Microtubules. *Angew. Chem. Int. Ed Engl.* 54, 10347–10351.
- Kaech, S., Parmar, H., Roelandse, M., Bornmann, C., and Matus, A. (2001). Cytoskeletal microdifferentiation: a mechanism for organizing morphological plasticity in dendrites. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* 98, 7086–7092.
- Kanai, Y., Takemura, R., Oshima, T., Mori, H., Ihara, Y., Yanagisawa, M., Masaki, T., and Hirokawa, N. (1989). Expression of multiple tau isoforms and microtubule bundle formation in fibroblasts transfected with a single tau cDNA. *J. Cell Biol.* 109, 1173–1184.
- Kanai, Y., Chen, J., and Hirokawa, N. (1992). Microtubule bundling by tau proteins in vivo: analysis of functional domains. *EMBO J.* 11, 3953.
- Kang, F., Purich, D.L., and Southwick, F.S. (1999). Profilin promotes barbed-end actin filament assembly without lowering the critical concentration. *J. Biol. Chem.* 274, 36963–36972.
- Kapitein, L.C., and Hoogenraad, C.C. (2015). Building the Neuronal Microtubule Cytoskeleton. *Neuron* 87, 492–506.
- Kapitein, L.C., Yau, K.W., and Hoogenraad, C.C. (2010). Microtubule dynamics in dendritic spines. *Methods Cell Biol.* 97, 111–132.
- Kappeler, C., Saillour, Y., Baudoin, J.-P., Tuy, F.P.D., Alvarez, C., Houbon, C., Gaspar, P., Hamard, G., Chelly, J., Métin, C., et al. (2006). Branching and nucleokinesis defects in migrating interneurons derived from doublecortin knockout mice. *Hum. Mol. Genet.* 15, 1387–1400.
- Kar, S., Fan, J., Smith, M.J., Goedert, M., and Amos, L.A. (2003). Repeat motifs of tau bind to the insides of microtubules in the absence of taxol. *EMBO J.* 22, 70–77.
- Karabay, A., Yu, W., Solowska, J.M., Baird, D.H., and Baas, P.W. (2004). Axonal growth is sensitive to the levels of katanin, a protein that severs microtubules. *J. Neurosci. Off. J. Soc. Neurosci.* 24, 5778–5788.
- Kawasaki, Y., Senda, T., Ishidate, T., Koyama, R., Morishita, T., Iwayama, Y., Higuchi, O., and Akiyama, T. (2000). Asef, a link between the tumor suppressor APC and G-protein signaling. *Science* 289, 1194–1197.
- Kawasaki, Y., Sato, R., and Akiyama, T. (2003). Mutated APC and Asef are involved in the migration of colorectal tumour cells. *Nat. Cell Biol.* 5, 211–215.
- Kawska, A., Carvalho, K., Manzi, J., Boujemaa-Paterski, R., Blanchoin, L., Martiel, J.-L., and Sykes, C. (2012). How actin network dynamics control the onset of actin-based motility. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* 109, 14440–14445.
- Khaitlina, S.Y. (2001). Functional specificity of actin isoforms. *Int. Rev. Cytol.* 202, 35–98.
- Khawaja, S., Gundersen, G.G., and Bulinski, J.C. (1988). Enhanced stability of microtubules enriched in dephosphorylated tubulin is not a direct function of dephosphorylation level. *J. Cell Biol.* 106, 141–149.
- Kholmanskikh, S.S., Koeller, H.B., Wynshaw-Boris, A., Gomez, T., Letourneau, P.C., and Ross, M.E. (2006). Calcium-dependent interaction of Lis1 with IQGAP1 and Cdc42 promotes neuronal motility. *Nat. Neurosci.* 9, 50–57.
- Kidd, M. (1963). Paired helical filaments in electron microscopy of Alzheimer's disease. *Nature* 197, 192–193.
- Kikkawa, M., Ishikawa, T., Nakata, T., Wakabayashi, T., and Hirokawa, N. (1994). Direct visualization of the microtubule lattice seam both in vitro and in vivo. *J. Cell Biol.* 127, 1965–1971.
- Kimura, T., Watanabe, H., Iwamatsu, A., and Kaibuchi, K. (2005). Tubulin and CRMP-2 complex is transported via Kinesin-1. *J. Neurochem.* 93, 1371–1382.

- Kinoshita, K., Arnal, I., Desai, A., Drechsel, D.N., and Hyman, A.A. (2001). Reconstitution of physiological microtubule dynamics using purified components. *Science* 294, 1340–1343.
- Kinoshita, K., Noetzel, T.L., Arnal, I., Drechsel, D.N., and Hyman, A.A. (2006). Global and local control of microtubule destabilization promoted by a catastrophe kinesin MCAK/XKCM1. *J. Muscle Res. Cell Motil.* 27, 107–114.
- Kiris, E., Ventimiglia, D., Sargin, M.E., Gaylord, M.R., Altinok, A., Rose, K., Manjunath, B.S., Jordan, M.A., Wilson, L., and Feinstein, S.C. (2011). Combinatorial Tau pseudophosphorylation: markedly different regulatory effects on microtubule assembly and dynamic instability than the sum of the individual parts. *J. Biol. Chem.* 286, 14257–14270.
- Klein, M.G., Shi, W., Ramagopal, U., Tseng, Y., Wirtz, D., Kovar, D.R., Staiger, C.J., and Almo, S.C. (2004). Structure of the actin crosslinking core of fimbrin. *Struct. Lond. Engl.* 12, 999–1013.
- Kneussel, M., and Loebrich, S. (2007). Trafficking and synaptic anchoring of ionotropic inhibitory neurotransmitter receptors. *Biol. Cell Auspices Eur. Cell Biol. Organ.* 99, 297–309.
- Knops, J., Kosik, K.S., Lee, G., Pardee, J.D., Cohen-Gould, L., and McConlogue, L. (1991). Overexpression of tau in a nonneuronal cell induces long cellular processes. *J. Cell Biol.* 114, 725–733.
- Kodama, A., Karakesisoglou, I., Wong, E., Vaezi, A., and Fuchs, E. (2003). ACF7: an essential integrator of microtubule dynamics. *Cell* 115, 343–354.
- Köhler, S., and Bausch, A.R. (2012). Contraction mechanisms in composite active actin networks. *PLoS One* 7, e39869.
- Kolarova, M., García-Sierra, F., Bartos, A., Ricny, J., and Ripova, D. (2012). Structure and Pathology of Tau Protein in Alzheimer Disease. *Int. J. Alzheimer's Dis.* 2012, e731526.
- Kopeck, C.D., Li, B., Wei, W., Boehm, J., and Malinow, R. (2006). Glutamate receptor exocytosis and spine enlargement during chemically induced long-term potentiation. *J. Neurosci. Off. J. Soc. Neurosci.* 26, 2000–2009.
- Kosik, K.S., Orecchio, L.D., Bakalis, S., and Neve, R.L. (1989). Developmentally regulated expression of specific tau sequences. *Neuron* 2, 1389–1397.
- Kovacech, B., and Novak, M. (2010). Tau truncation is a productive posttranslational modification of neurofibrillary degeneration in Alzheimer's disease. *Curr. Alzheimer Res.* 7, 708–716.
- Kovar, D.R., Harris, E.S., Mahaffy, R., Higgs, H.N., and Pollard, T.D. (2006). Control of the assembly of ATP- and ADP-actin by formins and profilin. *Cell* 124, 423–435.
- Krendel, M., Zenke, F.T., and Bokoch, G.M. (2002). Nucleotide exchange factor GEF-H1 mediates cross-talk between microtubules and the actin cytoskeleton. *Nat. Cell Biol.* 4, 294–301.
- Kuriu, T., Inoue, A., Bito, H., Sobue, K., and Okabe, S. (2006). Differential control of postsynaptic density scaffolds via actin-dependent and -independent mechanisms. *J. Neurosci. Off. J. Soc. Neurosci.* 26, 7693–7706.
- Ladner, C.J., Czech, J., Maurice, J., Lorens, S.A., and Lee, J.M. (1996). Reduction of calcineurin enzymatic activity in Alzheimer's disease: correlation with neuropathologic changes. *J. Neuropathol. Exp. Neurol.* 55, 924–931.
- Lafont, F., Rouget, M., Rousselet, A., Valenza, C., and Prochiantz, A. (1993). Specific responses of axons and dendrites to cytoskeleton perturbations: an in vitro study. *J. Cell Sci.* 104 (Pt 2), 433–443.
- Landis, D.M., and Reese, T.S. (1983). Cytoplasmic organization in cerebellar dendritic spines. *J. Cell Biol.* 97, 1169–1178.
- Lansbergen, G., and Akhmanova, A. (2006). Microtubule plus end: a hub of cellular activities. *Traffic Cph. Den.* 7, 499–507.
- Lantz, V.A., and Miller, K.G. (1998). A class VI unconventional myosin is associated with a homologue of a microtubule-binding protein, cytoplasmic linker protein-170, in neurons and at the posterior pole of *Drosophila* embryos. *J. Cell Biol.* 140, 897–910.
- Laporte, D., Ojkic, N., Vavylonis, D., and Wu, J.-Q. (2012). α -Actinin and fimbrin cooperate with myosin II to organize actomyosin bundles during contractile-ring assembly. *Mol. Biol. Cell* 23, 3094–3110.
- Lappalainen, P., and Drubin, D.G. (1997). Cofilin promotes rapid actin filament turnover in vivo. *Nature* 388, 78–82.

- Lee, K.D., and Hollenbeck, P.J. (1995). Phosphorylation of kinesin in vivo correlates with organelle association and neurite outgrowth. *J. Biol. Chem.* 270, 5600–5605.
- Lee, S., and Kolodziej, P.A. (2002). Short Stop provides an essential link between F-actin and microtubules during axon extension. *Development* 129, 1195–1204.
- Lee, G., Cowan, N., and Kirschner, M. (1988). The primary structure and heterogeneity of tau protein from mouse brain. *Science* 239, 285–288.
- Lee, G., Newman, S.T., Gard, D.L., Band, H., and Panchamoorthy, G. (1998). Tau interacts with src-family non-receptor tyrosine kinases. *J. Cell Sci.* 111 (Pt 21), 3167–3177.
- Lee, H., Engel, U., Rusch, J., Scherrer, S., Sheard, K., and Van Vactor, D. (2004). The microtubule plus end tracking protein Orbit/MAST/CLASP acts downstream of the tyrosine kinase Abl in mediating axon guidance. *Neuron* 42, 913–926.
- Lee, V.M., Balin, B.J., Otvos, L., and Trojanowski, J.Q. (1991). A68: a major subunit of paired helical filaments and derivatized forms of normal Tau. *Science* 251, 675–678.
- Lee, V.M., Goedert, M., and Trojanowski, J.Q. (2001). Neurodegenerative tauopathies. *Annu. Rev. Neurosci.* 24, 1121–1159.
- Lefebvre, T., Ferreira, S., Dupont-Wallois, L., Bussi re, T., Dupire, M.-J., Delacourte, A., Michalski, J.-C., and Caillet-Boudin, M.-L. (2003). Evidence of a balance between phosphorylation and O-GlcNAc glycosylation of Tau proteins--a role in nuclear localization. *Biochim. Biophys. Acta* 1619, 167–176.
- Leung, C.L., Sun, D., Zheng, M., Knowles, D.R., and Liem, R.K. (1999). Microtubule actin cross-linking factor (MACF): a hybrid of dystonin and dystrophin that can interact with the actin and microtubule cytoskeletons. *J. Cell Biol.* 147, 1275–1286.
- Levy, S.F., Leboeuf, A.C., Massie, M.R., Jordan, M.A., Wilson, L., and Feinstein, S.C. (2005). Three- and four-repeat tau regulate the dynamic instability of two distinct microtubule subpopulations in qualitatively different manners. Implications for neurodegeneration. *J. Biol. Chem.* 280, 13520–13528.
- Lewis, A.K., and Bridgman, P.C. (1992). Nerve growth cone lamellipodia contain two populations of actin filaments that differ in organization and polarity. *J. Cell Biol.* 119, 1219–1243.
- Lewis, J., McGowan, E., Rockwood, J., Melrose, H., Nacharaju, P., Van Slegtenhorst, M., Gwinn-Hardy, K., Paul Murphy, M., Baker, M., Yu, X., et al. (2000). Neurofibrillary tangles, amyotrophy and progressive motor disturbance in mice expressing mutant (P301L) tau protein. *Nat. Genet.* 25, 402–405.
- Lewis, S.A., Wang, D.H., and Cowan, N.J. (1988). Microtubule-associated protein MAP2 shares a microtubule binding motif with tau protein. *Science* 242, 936–939.
- Li, B., Chohan, M.O., Grundke-Iqbal, I., and Iqbal, K. (2007). Disruption of microtubule network by Alzheimer abnormally hyperphosphorylated tau. *Acta Neuropathol. (Berl.)* 113, 501–511.
- Li, H., DeRosier, D.J., Nicholson, W.V., Nogales, E., and Downing, K.H. (2002). Microtubule structure at 8 Å resolution. *Struct. Lond. Engl.* 1993 10, 1317–1328.
- Li, L., Fothergill, T., Hutchins, B.I., Dent, E.W., and Kalil, K. (2014). Wnt5a evokes cortical axon outgrowth and repulsive guidance by tau mediated reorganization of dynamic microtubules: Wnt5a Regulates Growth Cone MTs via Tau. *Dev. Neurobiol.* 74, 797–817.
- Li, X.-H., Culver, J.A., and Rhoades, E. (2015). Tau Binds to Multiple Tubulin Dimers with Helical Structure. *J. Am. Chem. Soc.* 137, 9218–9221.
- Lichtenberg, B., Mandelkow, E.M., Hagestedt, T., and Mandelkow, E. (1988). Structure and elasticity of microtubule-associated protein tau. *Nature* 334, 359–362.
- Lieleg, O., Schmoller, K.M., Claessens, M.M. a. E., and Bausch, A.R. (2009). Cytoskeletal polymer networks: viscoelastic properties are determined by the microscopic interaction potential of cross-links. *Biophys. J.* 96, 4725–4732.
- Liu, F., Zaidi, T., Iqbal, K., Grundke-Iqbal, I., and Gong, C.-X. (2002). Aberrant glycosylation modulates phosphorylation of tau by protein kinase A and dephosphorylation of tau by protein phosphatase 2A and 5. *Neuroscience* 115, 829–837.
- Liu, F., Grundke-Iqbal, I., Iqbal, K., and Gong, C.-X. (2005). Contributions of protein phosphatases PP1, PP2A, PP2B and PP5 to the regulation of tau phosphorylation. *Eur. J. Neurosci.* 22, 1942–1950.

- Liu, F., Li, B., Tung, E.-J., Grundke-Iqbal, I., Iqbal, K., and Gong, C.-X. (2007). Site-specific effects of tau phosphorylation on its microtubule assembly activity and self-aggregation. *Eur. J. Neurosci.* *26*, 3429–3436.
- Loomis, P.A., Howard, T.H., Castleberry, R.P., and Binder, L.I. (1990). Identification of nuclear tau isoforms in human neuroblastoma cells. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* *87*, 8422–8426.
- Lopez, L.A., and Sheetz, M.P. (1993). Steric inhibition of cytoplasmic dynein and kinesin motility by MAP2. *Cell Motil. Cytoskeleton* *24*, 1–16.
- LoPresti, P., Szuchet, S., Papasozomenos, S.C., Zinkowski, R.P., and Binder, L.I. (1995). Functional implications for the microtubule-associated protein tau: localization in oligodendrocytes. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* *92*, 10369–10373.
- Lovestone, S., and Reynolds, C.H. (1997). The phosphorylation of tau: a critical stage in neurodevelopment and neurodegenerative processes. *Neuroscience* *78*, 309–324.
- Löwe, J., Li, H., Downing, K.H., and Nogales, E. (2001). Refined structure of alpha beta-tubulin at 3.5 Å resolution. *J. Mol. Biol.* *313*, 1045–1057.
- Lowery, L.A., and Van Vactor, D. (2009). The trip of the tip: understanding the growth cone machinery. *Nat. Rev. Mol. Cell Biol.* *10*, 332–343.
- Lu, M., and Kosik, K.S. (2001). Competition for microtubule-binding with dual expression of tau missense and splice isoforms. *Mol. Biol. Cell* *12*, 171–184.
- Luan, Q., and Nolen, B.J. (2013). Structural basis for regulation of Arp2/3 complex by GMF. *Nat. Struct. Mol. Biol.* *20*, 1062–1068.
- Lucas, J.R., Courtney, S., Hassfurder, M., Dhingra, S., Bryant, A., and Shaw, S.L. (2011). Microtubule-associated proteins MAP65-1 and MAP65-2 positively regulate axial cell growth in etiolated *Arabidopsis* hypocotyls. *Plant Cell* *23*, 1889–1903.
- Luo, M., Leski, M.L., and Andreadis, A. (2004). Tau isoforms which contain the domain encoded by exon 6 and their role in neurite elongation. *J. Cell. Biochem.* *91*, 880–895.
- Mailliot, C., Bussi re, T., Hamdane, M., Sergeant, N., Caillet, M.L., Delacourte, A., and Bu e, L. (2000). Pathological tau phenotypes. The weight of mutations, polymorphisms, and differential neuronal vulnerabilities. *Ann. N. Y. Acad. Sci.* *920*, 107–114.
- Makrides, V., Massie, M.R., Feinstein, S.C., and Lew, J. (2004). Evidence for two distinct binding sites for tau on microtubules. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* *101*, 6746–6751.
- Mandato, C.A., and Bement, W.M. (2003). Actomyosin transports microtubules and microtubules control actomyosin recruitment during *Xenopus* oocyte wound healing. *Curr. Biol. CB* *13*, 1096–1105.
- Mandelkow, E.M., Schweers, O., Drewes, G., Biernat, J., Gustke, N., Trinczek, B., and Mandelkow, E. (1996). Structure, microtubule interactions, and phosphorylation of tau protein. *Ann. N. Y. Acad. Sci.* *777*, 96–106.
- Mandell, J.W., and Banker, G.A. (1996). A spatial gradient of tau protein phosphorylation in nascent axons. *J. Neurosci. Off. J. Soc. Neurosci.* *16*, 5727–5740.
- Mao, G., Buschmann, H., Doonan, J.H., and Lloyd, C.W. (2006). The role of MAP65-1 in microtubule bundling during *Zinnia* tracheary element formation. *J. Cell Sci.* *119*, 753–758.
- Mart nez-L pez, M.J., Alc ntara, S., Mascar , C., P rez-Brangul , F., Ruiz-Lozano, P., Maes, T., Soriano, E., and Buesa, C. (2005). Mouse neuron navigator 1, a novel microtubule-associated protein involved in neuronal migration. *Mol. Cell. Neurosci.* *28*, 599–612.
- Marx, A., Pless, J., Mandelkow, E.M., and Mandelkow, E. (2000). On the rigidity of the cytoskeleton: are MAPs crosslinkers or spacers of microtubules? *Cell. Mol. Biol. Noisy-Gd. Fr.* *46*, 949–965.
- Matthews-Roberson, T.A., Quintanilla, R.A., Ding, H., and Johnson, G.V.W. (2008). Immortalized cortical neurons expressing caspase-cleaved tau are sensitized to endoplasmic reticulum stress induced cell death. *Brain Res.* *1234*, 206–212.
- Matus, A. (2000). Actin-based plasticity in dendritic spines. *Science* *290*, 754–758.
- Matus, A. (2005). Growth of dendritic spines: a continuing story. *Curr. Opin. Neurobiol.* *15*, 67–72.
- Maurer, S.P., Bieling, P., Cope, J., Hoenger, A., and Surrey, T. (2011). GTPgammaS microtubules mimic the growing microtubule end structure recognized by end-binding proteins (EBs). *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* *108*, 3988–3993.
- Maurer, S.P., Fourniol, F.J., Bohner, G., Moores, C. a, and Surrey, T. (2012). EBs recognize a nucleotide-dependent structural cap at growing microtubule ends. *Cell* *149*, 371–382.

- McIlvain, J.M., Burkhardt, J.K., Hamm-Alvarez, S., Argon, Y., and Sheetz, M.P. (1994). Regulation of kinesin activity by phosphorylation of kinesin-associated proteins. *J. Biol. Chem.* 269, 19176–19182.
- Meichsner, M., Doll, T., Reddy, D., Weisshaar, B., and Matus, A. (1993). The low molecular weight form of microtubule-associated protein 2 is transported into both axons and dendrites. *Neuroscience* 54, 873–880.
- Metoz, F., Arnal, I., and Wade, R.H. (1997). Tomography without tilt: three-dimensional imaging of microtubule/motor complexes. *J. Struct. Biol.* 118, 159–168.
- Miller, M.L., and Johnson, G.V. (1995). Transglutaminase cross-linking of the tau protein. *J. Neurochem.* 65, 1760–1770.
- Mimori-Kiyosue, Y. (2011). Shaping microtubules into diverse patterns: molecular connections for setting up both ends. *Cytoskelet. Hoboken NJ* 68, 603–618.
- Mimori-Kiyosue, Y., Shiina, N., and Tsukita, S. (2000). The dynamic behavior of the APC-binding protein EB1 on the distal ends of microtubules. *Curr. Biol. CB* 10, 865–868.
- Mitchison, T.J., and Kirschner, M.W. (1985). Properties of the kinetochore in vitro. II. Microtubule capture and ATP-dependent translocation. *J. Cell Biol.* 101, 766–777.
- Mitchison, T., and Kirschner, M. (1984a). Microtubule assembly nucleated by isolated centrosomes. *Nature* 312, 232–237.
- Mitchison, T., and Kirschner, M. (1984b). Dynamic instability of microtubule growth. *Nature* 312, 237–242.
- Mok, Y.K., Lo, K.W., and Zhang, M. (2001). Structure of Tctex-1 and its interaction with cytoplasmic dynein intermediate chain. *J. Biol. Chem.* 276, 14067–14074.
- Mondragón-Rodríguez, S., Trillaud-Doppia, E., Dudilot, A., Bourgeois, C., Lauzon, M., Leclerc, N., and Boehm, J. (2012). Interaction of endogenous tau protein with synaptic proteins is regulated by N-methyl-D-aspartate receptor-dependent tau phosphorylation. *J. Biol. Chem.* 287, 32040–32053.
- Montejo de Garcini, E., Serrano, L., and Avila, J. (1986). Self assembly of microtubule associated protein tau into filaments resembling those found in Alzheimer disease. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 141, 790–796.
- Moraga, D.M., Nuñez, P., Garrido, J., and Maccioni, R.B. (1993). A tau fragment containing a repetitive sequence induces bundling of actin filaments. *J. Neurochem.* 61, 979–986.
- Moritz, M., Braunfeld, M.B., Guénebaud, V., Heuser, J., and Agard, D.A. (2000). Structure of the gamma-tubulin ring complex: a template for microtubule nucleation. *Nat. Cell Biol.* 2, 365–370.
- Morris, M., Maeda, S., Vossel, K., and Mucke, L. (2011). The many faces of tau. *Neuron* 70, 410–426.
- Morrison, E.E. (2007). Action and interactions at microtubule ends. *Cell. Mol. Life Sci. CMLS* 64, 307–317.
- Mukhopadhyay, R., and Hoh, J.H. (2001). AFM force measurements on microtubule-associated proteins: the projection domain exerts a long-range repulsive force. *FEBS Lett.* 505, 374–378.
- Mukhopadhyay, R., Kumar, S., and Hoh, J.H. (2004). Molecular mechanisms for organizing the neuronal cytoskeleton. *BioEssays News Rev. Mol. Cell. Dev. Biol.* 26, 1017–1025.
- Mukrasch, M.D., Biernat, J., von Bergen, M., Griesinger, C., Mandelkow, E., and Zweckstetter, M. (2005). Sites of tau important for aggregation populate {beta}-structure and bind to microtubules and polyanions. *J. Biol. Chem.* 280, 24978–24986.
- Mukrasch, M.D., von Bergen, M., Biernat, J., Fischer, D., Griesinger, C., Mandelkow, E., and Zweckstetter, M. (2007). The “jaws” of the tau-microtubule interaction. *J. Biol. Chem.* 282, 12230–12239.
- Mukrasch, M.D., Bibow, S., Korukottu, J., Jeganathan, S., Biernat, J., Griesinger, C., Mandelkow, E., and Zweckstetter, M. (2009). Structural polymorphism of 441-residue tau at single residue resolution. *PLoS Biol.* 7, e34.
- Müller, R., Heinrich, M., Heck, S., Blohm, D., and Richter-Landsberg, C. (1997). Expression of microtubule-associated proteins MAP2 and tau in cultured rat brain oligodendrocytes. *Cell Tissue Res.* 288, 239–249.
- Mullins, R.D., Heuser, J.A., and Pollard, T.D. (1998). The interaction of Arp2/3 complex with actin: nucleation, high affinity pointed end capping, and formation of branching networks of filaments. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* 95, 6181–6186.

- Münch, G., Kuhla, B., Lüth, H.-J., Arendt, T., and Robinson, S.R. (2003). Anti-AGEing defences against Alzheimer's disease. *Biochem. Soc. Trans.* *31*, 1397–1399.
- Murakami, K., Yasunaga, T., Noguchi, T.Q.P., Gomibuchi, Y., Ngo, K.X., Uyeda, T.Q.P., and Wakabayashi, T. (2010). Structural basis for actin assembly, activation of ATP hydrolysis, and delayed phosphate release. *Cell* *143*, 275–287.
- Murrell, M.P., and Gardel, M.L. (2012). F-actin buckling coordinates contractility and severing in a biomimetic actomyosin cortex. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* *109*, 20820–20825.
- Mylonas, E., Hascher, A., Bernadó, P., Blackledge, M., Mandelkow, E., and Svergun, D.I. (2008). Domain conformation of tau protein studied by solution small-angle X-ray scattering. *Biochemistry (Mosc.)* *47*, 10345–10353.
- Nacharaju, P., Ko, L., and Yen, S.H. (1997). Characterization of in vitro glycation sites of tau. *J. Neurochem.* *69*, 1709–1719.
- Nagano, F., Orita, S., Sasaki, T., Naito, A., Sakaguchi, G., Maeda, M., Watanabe, T., Kominami, E., Uchiyama, Y., and Takai, Y. (1998). Interaction of Doc2 with tctex-1, a light chain of cytoplasmic dynein. Implication in dynein-dependent vesicle transport. *J. Biol. Chem.* *273*, 30065–30068.
- Nakata, T., Terada, S., and Hirokawa, N. (1998). Visualization of the dynamics of synaptic vesicle and plasma membrane proteins in living axons. *J. Cell Biol.* *140*, 659–674.
- Näthke, I.S., Adams, C.L., Polakis, P., Sellin, J.H., and Nelson, W.J. (1996). The adenomatous polyposis coli tumor suppressor protein localizes to plasma membrane sites involved in active cell migration. *J. Cell Biol.* *134*, 165–179.
- Neve, R.L., Selkoe, D.J., Kurnit, D.M., and Kosik, K.S. (1986). A cDNA for a human microtubule associated protein 2 epitope in the Alzheimer neurofibrillary tangle. *Brain Res.* *387*, 193–196.
- Nogales, E., Wolf, S.G., and Downing, K.H. (1998). Structure of the alpha beta tubulin dimer by electron crystallography. *Nature* *391*, 199–203.
- Noiges, R., Eichinger, R., Kutschera, W., Fischer, I., Nemeth, Z., Wiche, G., and Propst, F. (2002). Microtubule-associated protein 1A (MAP1A) and MAP1B: light chains determine distinct functional properties. *J. Neurosci. Off. J. Soc. Neurosci.* *22*, 2106–2114.
- Norlund, M.A., Lee, J.M., Zainelli, G.M., and Muma, N.A. (1999). Elevated transglutaminase-induced bonds in PHF tau in Alzheimer's disease. *Brain Res.* *851*, 154–163.
- Ogawa, T., Nitta, R., Okada, Y., and Hirokawa, N. (2004). A common mechanism for microtubule destabilizers-M type kinesins stabilize curling of the protofilament using the class-specific neck and loops. *Cell* *116*, 591–602.
- Okamoto, K.-I., Nagai, T., Miyawaki, A., and Hayashi, Y. (2004). Rapid and persistent modulation of actin dynamics regulates postsynaptic reorganization underlying bidirectional plasticity. *Nat. Neurosci.* *7*, 1104–1112.
- Olmsted, J.B., Asnes, C.F., Parysek, L.M., Lyon, H.D., and Kidder, G.M. (1986). Distribution of MAP-4 in cells and in adult and developing mouse tissues. *Ann. N. Y. Acad. Sci.* *466*, 292–305.
- Ono, S. (2007). Mechanism of depolymerization and severing of actin filaments and its significance in cytoskeletal dynamics. *Int. Rev. Cytol.* *258*, 1–82.
- Orbán-Németh, Z., Simader, H., Badurek, S., Tranciková, A., and Propst, F. (2005). Microtubule-associated protein 1S, a short and ubiquitously expressed member of the microtubule-associated protein 1 family. *J. Biol. Chem.* *280*, 2257–2265.
- Ori-McKenney, K.M., Jan, L.Y., and Jan, Y.-N. (2012). Golgi outposts shape dendrite morphology by functioning as sites of acentrosomal microtubule nucleation in neurons. *Neuron* *76*, 921–930.
- Ozer, R.S., and Halpain, S. (2000). Phosphorylation-dependent localization of microtubule-associated protein MAP2c to the actin cytoskeleton. *Mol. Biol. Cell* *11*, 3573–3587.
- Pak, C.W., Flynn, K.C., and Bamberg, J.R. (2008). Actin-binding proteins take the reins in growth cones. *Nat. Rev. Neurosci.* *9*, 136–147.
- Palazzo, A., Ackerman, B., and Gundersen, G.G. (2003). Cell biology: Tubulin acetylation and cell motility. *Nature* *421*, 230.
- Palazzo, A.F., Cook, T.A., Alberts, A.S., and Gundersen, G.G. (2001). mDia mediates Rho-regulated formation and orientation of stable microtubules. *Nat. Cell Biol.* *3*, 723–729.
- Panda, D., Goode, B.L., Feinstein, S.C., and Wilson, L. (1995). Kinetic stabilization of microtubule dynamics at steady state by tau and microtubule-binding domains of tau. *Biochemistry (Mosc.)* *34*, 11117–11127.

- Panda, D., Samuel, J.C., Massie, M., Feinstein, S.C., and Wilson, L. (2003). Differential regulation of microtubule dynamics by three- and four-repeat tau: implications for the onset of neurodegenerative disease. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* *100*, 9548–9553.
- Paturle-Lafanechère, L., Manier, M., Trigault, N., Pirollet, F., Mazarguil, H., and Job, D. (1994). Accumulation of delta 2-tubulin, a major tubulin variant that cannot be tyrosinated, in neuronal tissues and in stable microtubule assemblies. *J. Cell Sci.* *107 (Pt 6)*, 1529–1543.
- Pavlov, D., Muhrad, A., Cooper, J., Wear, M., and Reisler, E. (2007). Actin filament severing by cofilin. *J. Mol. Biol.* *365*, 1350–1358.
- Pedrotti, B., and Islam, K. (1994). Purified native microtubule associated protein MAP1A: kinetics of microtubule assembly and MAP1A/tubulin stoichiometry. *Biochemistry (Mosc.)* *33*, 12463–12470.
- Pedrotti, B., and Islam, K. (1996). Dephosphorylated but not phosphorylated microtubule associated protein MAP1B binds to microfilaments. *FEBS Lett.* *388*, 131–133.
- Pedrotti, B., Colombo, R., and Islam, K. (1994a). Microtubule associated protein MAP1A is an actin-binding and crosslinking protein. *Cell Motil. Cytoskeleton* *29*, 110–116.
- Pedrotti, B., Colombo, R., and Islam, K. (1994b). Interactions of microtubule-associated protein MAP2 with unpolymerized and polymerized tubulin and actin using a 96-well microtiter plate solid-phase immunoassay. *Biochemistry (Mosc.)* *33*, 8798–8806.
- Perez, F., Diamantopoulos, G.S., Stalder, R., and Kreis, T.E. (1999). CLIP-170 highlights growing microtubule ends in vivo. *Cell* *96*, 517–527.
- Perez, M., Santa-Maria, I., Gomez de Barreda, E., Zhu, X., Cuadros, R., Cabrero, J.R., Sanchez-Madrid, F., Dawson, H.N., Vitek, M.P., Perry, G., et al. (2009). Tau--an inhibitor of deacetylase HDAC6 function. *J. Neurochem.* *109*, 1756–1766.
- Peris, L., Thery, M., Fauré, J., Saoudi, Y., Lafanechère, L., Chilton, J.K., Gordon-Weeks, P., Galjart, N., Bornens, M., Wordeman, L., et al. (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., Wagenbach, M., Lafanechère, L., Brocard, J., Moore, A.T., Kozielski, F., Job, D., Wordeman, L., and Andrieux, A. (2009). Motor-dependent microtubule disassembly driven by tubulin tyrosination. *J. Cell Biol.* *185*, 1159–1166.
- Pollard, T.D., and Borisy, G.G. (2003). Cellular motility driven by assembly and disassembly of actin filaments. *Cell* *112*, 453–465.
- Pollard, T.D., and Cooper, J.A. (2009). Actin, a Central Player in Cell Shape and Movement. *Science* *326*, 1208–1212.
- Pollard, T.D., Blanchoin, L., and Mullins, R.D. (2000). Molecular mechanisms controlling actin filament dynamics in nonmuscle cells. *Annu. Rev. Biophys. Biomol. Struct.* *29*, 545–576.
- Pooler, A.M., Phillips, E.C., Lau, D.H.W., Noble, W., and Hanger, D.P. (2013). Physiological release of endogenous tau is stimulated by neuronal activity. *EMBO Rep.* *14*, 389–394.
- Poorkaj, P., Bird, T.D., Wijsman, E., Nemens, E., Garruto, R.M., Anderson, L., Andreadis, A., Wiederholt, W.C., Raskind, M., and Schellenberg, G.D. (1998). Tau is a candidate gene for chromosome 17 frontotemporal dementia. *Ann. Neurol.* *43*, 815–825.
- Portran, D., Zoccoler, M., Gaillard, J., Stoppin-Mellet, V., Neumann, E., Arnal, I., Martiel, J.L., and Vantard, M. (2013). MAP65/Ase1 promote microtubule flexibility. *Mol. Biol. Cell* *24*, 1964–1973.
- Preuss, U., Biernat, J., Mandelkow, E.M., and Mandelkow, E. (1997). The “jaws” model of tau-microtubule interaction examined in CHO cells. *J. Cell Sci.* *110*, 789–800.
- Pring, M., Weber, A., and Bubba, M.R. (1992). Profilin-actin complexes directly elongate actin filaments at the barbed end. *Biochemistry (Mosc.)* *31*, 1827–1836.
- Pring, M., Evangelista, M., Boone, C., Yang, C., and Zigmond, S.H. (2003). Mechanism of formin-induced nucleation of actin filaments. *Biochemistry (Mosc.)* *42*, 486–496.
- Pruyne, D., Evangelista, M., Yang, C., Bi, E., Zigmond, S., Bretscher, A., and Boone, C. (2002). Role of formins in actin assembly: nucleation and barbed-end association. *Science* *297*, 612–615.
- Qi, H., Cantrelle, F.-X., Benhelli-Mokrani, H., Smet-Nocca, C., Buée, L., Lippens, G., Bonnefoy, E., Galas, M.-C., and Landrieu, I. (2015). Nuclear magnetic resonance spectroscopy characterization of interaction of Tau with DNA and its regulation by phosphorylation. *Biochemistry (Mosc.)* *54*, 1525–1533.
- Qu, M., Li, H., Tian, R., Nie, C., Liu, Y., Han, B., and He, R. (2004). Neuronal tau induces DNA conformational changes observed by atomic force microscopy. *Neuroreport* *15*, 2723–2727.

- Quarmby, L. (2000). Cellular Samurai: katanin and the severing of microtubules. *J. Cell Sci.* *113* (Pt 16), 2821–2827.
- Quinlan, M.E., Heuser, J.E., Kerkhoff, E., and Mullins, R.D. (2005). *Drosophila* Spire is an actin nucleation factor. *Nature* *433*, 382–388.
- Quintanilla, R.A., Dolan, P.J., Jin, Y.N., and Johnson, G.V.W. (2012). Truncated tau and A β cooperatively impair mitochondria in primary neurons. *Neurobiol. Aging* *33*, 619.e25–e35.
- Reilein, A.R., Tint, I.S., Peunova, N.I., Enikolopov, G.N., and Gelfand, V.I. (1998). Regulation of organelle movement in melanophores by protein kinase A (PKA), protein kinase C (PKC), and protein phosphatase 2A (PP2A). *J. Cell Biol.* *142*, 803–813.
- Ren, X.D., Kiosses, W.B., and Schwartz, M.A. (1999). Regulation of the small GTP-binding protein Rho by cell adhesion and the cytoskeleton. *EMBO J.* *18*, 578–585.
- Revenu, C., Athman, R., Robine, S., and Louvard, D. (2004). The co-workers of actin filaments: from cell structures to signals. *Nat. Rev. Mol. Cell Biol.* *5*, 635–646.
- Reymann, A.-C., Boujemaa-Paterski, R., Martiel, J.-L., Guérin, C., Cao, W., Chin, H.F., De La Cruz, E.M., Théry, M., and Blanchoin, L. (2012). Actin network architecture can determine myosin motor activity. *Science* *336*, 1310–1314.
- Reynolds, C.H., Garwood, C.J., Wray, S., Price, C., Kellie, S., Perera, T., Zvelebil, M., Yang, A., Sheppard, P.W., Varndell, I.M., et al. (2008). Phosphorylation regulates tau interactions with Src homology 3 domains of phosphatidylinositol 3-kinase, phospholipase Cgamma1, Grb2, and Src family kinases. *J. Biol. Chem.* *283*, 18177–18186.
- Rice, L.M., Montabana, E.A., and Agard, D.A. (2008). The lattice as allosteric effector: structural studies of alpha-beta- and gamma-tubulin clarify the role of GTP in microtubule assembly. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* *105*, 5378–5383.
- Rickard, J.E., and Kreis, T.E. (1990). Identification of a novel nucleotide-sensitive microtubule-binding protein in HeLa cells. *J. Cell Biol.* *110*, 1623–1633.
- Ridley, A.J. (2001). Rho GTPases and cell migration. *J. Cell Sci.* *114*, 2713–2722.
- Robinson, R.C., Turbedsky, K., Kaiser, D.A., Marchand, J.B., Higgs, H.N., Choe, S., and Pollard, T.D. (2001). Crystal structure of Arp2/3 complex. *Science* *294*, 1679–1684.
- Rodriguez, O.C., Schaefer, A.W., Mandato, C.A., Forscher, P., Bement, W.M., and Waterman-storer, C.M. (2003). Conserved microtubule – actin interactions in cell movement and morphogenesis. *J. Cell Biol.* *5*, 599–609.
- Roger, B., Al-Bassam, J., Dehmelt, L., Milligan, R.A., and Halpain, S. (2004). MAP2c, but Not Tau, Binds and Bundles F-Actin via Its Microtubule Binding Domain. *Curr. Biol.* *14*, 363–371.
- Rohn, T.T., Rissman, R.A., Davis, M.C., Kim, Y.E., Cotman, C.W., and Head, E. (2002). Caspase-9 activation and caspase cleavage of tau in the Alzheimer's disease brain. *Neurobiol. Dis.* *11*, 341–354.
- Roll-Mecak, A., and Vale, R.D. (2008). Structural basis of microtubule severing by the hereditary spastic paraplegia protein spastin. *Nature* *451*, 363–367.
- Romero, S., Le Clainche, C., Didry, D., Egile, C., Pantaloni, D., and Carlier, M.-F. (2004). Formin is a processive motor that requires profilin to accelerate actin assembly and associated ATP hydrolysis. *Cell* *119*, 419–429.
- Roos, J., Hummel, T., Ng, N., Klämbt, C., and Davis, G.W. (2000). *Drosophila* Futsch regulates synaptic microtubule organization and is necessary for synaptic growth. *Neuron* *26*, 371–382.
- Rosenberg, K.J., Ross, J.L., Feinstein, H.E., Feinstein, S.C., and Israelachvili, J. (2008). Complementary dimerization of microtubule-associated tau protein : Implications for microtubule bundling and tau-mediated pathogenesis. *PNAS* *105*, 7445–50.
- Rould, M.A., Wan, Q., Joel, P.B., Lowey, S., and Trybus, K.M. (2006). Crystal structures of expressed non-polymerizable monomeric actin in the ADP and ATP states. *J. Biol. Chem.* *281*, 31909–31919.
- Sablin, E.P., Dawson, J.F., VanLoock, M.S., Spudich, J.A., Egelman, E.H., and Fletterick, R.J. (2002). How does ATP hydrolysis control actin's associations? *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* *99*, 10945–10947.
- Sahara, N., Maeda, S., Murayama, M., Suzuki, T., Dohmae, N., Yen, S.-H., and Takashima, A. (2007). Assembly of two distinct dimers and higher-order oligomers from full-length tau: Distinct types of tau dimers. *Eur. J. Neurosci.* *25*, 3020–3029.

- Salmon, W.C., Adams, M.C., and Waterman-Storer, C.M. (2002). Dual-wavelength fluorescent speckle microscopy reveals coupling of microtubule and actin movements in migrating cells. *J. Cell Biol.* *158*, 31–37.
- Salvador, L.M., Flynn, M.P., Avila, J., Reierstad, S., Maizels, E.T., Alam, H., Park, Y., Scott, J.D., Carr, D.W., and Hunzicker-Dunn, M. (2004). Neuronal microtubule-associated protein 2D is a dual a-kinase anchoring protein expressed in rat ovarian granulosa cells. *J. Biol. Chem.* *279*, 27621–27632.
- Sammak, P.J., and Borisy, G.G. (1988). Direct observation of microtubule dynamics in living cells. *Nature* *332*, 724–726.
- Santarella, R.A., Skinotis, G., Goldie, K.N., Tittmann, P., Gross, H., Mandelkow, E.-M., Mandelkow, E., and Hoenger, A. (2004). Surface-decoration of microtubules by human tau. *J. Mol. Biol.* *339*, 539–553.
- Sapir, T., Elbaum, M., and Reiner, O. (1997). Reduction of microtubule catastrophe events by LIS1, platelet-activating factor acetylhydrolase subunit. *EMBO J.* *16*, 6977–6984.
- Sato-Harada, R., Okabe, S., Umeyama, T., Kanai, Y., and Hirokawa, N. (1996). Microtubule-associated proteins regulate microtubule function as the track for intracellular membrane organelle transports. *Cell Struct. Funct.* *21*, 283–295.
- Sattilaro, R.F. (1986). Interaction of microtubule-associated protein 2 with actin filaments. *Biochemistry (Mosc.)* *25*, 2003–2009.
- Schaar, B.T., Kinoshita, K., and McConnell, S.K. (2004). Doublecortin microtubule affinity is regulated by a balance of kinase and phosphatase activity at the leading edge of migrating neurons. *Neuron* *41*, 203–213.
- Schaedel, L., John, K., Gaillard, J., Nachury, M.V., Blanchoin, L., and Théry, M. (2015). Microtubules self-repair in response to mechanical stress. *Nat. Mater.*
- Schaefer, A.W., Kabir, N., and Forscher, P. (2002a). Filopodia and actin arcs guide the assembly and transport of two populations of microtubules with unique dynamic parameters in neuronal growth cones. *J. Cell Biol.* *158*, 139–152.
- Schaefer, A.W., Kabir, N., and Forscher, P. (2002b). Filopodia and actin arcs guide the assembly and transport of two populations of microtubules with unique dynamic parameters in neuronal growth cones. *J. Cell Biol.* *158*, 139–152.
- Schaefer, A.W., Schoonderwoert, V.T.G., Ji, L., Mederios, N., Danuser, G., and Forscher, P. (2008). Coordination of actin filament and microtubule dynamics during neurite outgrowth. *Dev. Cell* *15*, 146–162.
- Schafer, D.A., and Cooper, J.A. (1995). Control of actin assembly at filament ends. *Annu. Rev. Cell Dev. Biol.* *11*, 497–518.
- Schek, H.T., Gardner, M.K., Cheng, J., Odde, D.J., and Hunt, A.J. (2007). Microtubule assembly dynamics at the nanoscale. *Curr. Biol. CB* *17*, 1445–1455.
- Schlager, M.A., and Hoogenraad, C.C. (2009). Basic mechanisms for recognition and transport of synaptic cargos. *Mol. Brain* *2*, 25.
- Schmoller, K.M., Lieleg, O., and Bausch, A.R. (2008). Cross-linking molecules modify composite actin networks independently. *Phys. Rev. Lett.* *101*, 118102.
- Schoenfeld, T.A., McKerracher, L., Obar, R., and Vallee, R.B. (1989). MAP 1A and MAP 1B are structurally related microtubule associated proteins with distinct developmental patterns in the CNS. *J. Neurosci. Off. J. Soc. Neurosci.* *9*, 1712–1730.
- Schubert, V., Da Silva, J.S., and Dotti, C.G. (2006). Localized recruitment and activation of RhoA underlies dendritic spine morphology in a glutamate receptor-dependent manner. *J. Cell Biol.* *172*, 453–467.
- Schulze, E., and Kirschner, M. (1988). New features of microtubule behaviour observed in vivo. *Nature* *334*, 356–359.
- Schuyler, S.C., and Pellman, D. (2001). Microtubule “plus-end-tracking proteins”: The end is just the beginning. *Cell* *105*, 421–424.

- Schweers, O., Schönbrunn-Hanebeck, E., Marx, A., and Mandelkow, E. (1994). Structural studies of tau protein and Alzheimer paired helical filaments show no evidence for beta-structure. *J. Biol. Chem.* 269, 24290–24297.
- Schweers, O., Mandelkow, E.M., Biernat, J., and Mandelkow, E. (1995). Oxidation of cysteine-322 in the repeat domain of microtubule-associated protein tau controls the in vitro assembly of paired helical filaments. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* 92, 8463–8467.
- Scott, C.W., Klika, A.B., Lo, M.M.S., Norris, T.E., and Caputo, C.B. (1992). Tau protein induces bundling of microtubules in vitro: comparison of different tau isoforms and a tau protein fragment. *J. Neurosci. Res.* 33, 19–29.
- Seetapun, D., Castle, B.T., McIntyre, A.J., Tran, P.T., and Odde, D.J. (2012). Estimating the microtubule GTP cap size in vivo. *Curr. Biol. CB* 22, 1681–1687.
- Sekino, Y., Kojima, N., and Shirao, T. (2007). Role of actin cytoskeleton in dendritic spine morphogenesis. *Neurochem. Int.* 51, 92–104.
- Sergeant, N., Bussi re, T., Vermersch, P., Lejeune, J.P., and Delacourte, A. (1995). Isoelectric point differentiates PHF-tau from biopsy-derived human brain tau proteins. *Neuroreport* 6, 2217–2220.
- Sergeant, N., Delacourte, A., and Bu e, L. (2005). Tau protein as a differential biomarker of tauopathies. *Biochim. Biophys. Acta* 1739, 179–197.
- Sergeant, N., Bretteville, A., Hamdane, M., Caillet-Boudin, M.-L., Grognet, P., Bombois, S., Blum, D., Delacourte, A., Pasquier, F., Vanmechelen, E., et al. (2008). Biochemistry of Tau in Alzheimer’s disease and related neurological disorders. *Expert Rev. Proteomics* 5, 207–224.
- Shahpasand, K., Uemura, I., Saito, T., Asano, T., Hata, K., Shibata, K., Toyoshima, Y., Hasegawa, M., and Hisanaga, S.-I. (2012). Regulation of mitochondrial transport and inter-microtubule spacing by tau phosphorylation at the sites hyperphosphorylated in Alzheimer’s disease. *J. Neurosci. Off. J. Soc. Neurosci.* 32, 2430–2441.
- Sharma, N., Kress, Y., and Shafit-Zagardo, B. (1994). Antisense MAP-2 oligonucleotides induce changes in microtubule assembly and neuritic elongation in pre-existing neurites of rat cortical neurons. *Cell Motil. Cytoskeleton* 27, 234–247.
- Sharp, D.J., Yu, W., and Baas, P.W. (1995). Transport of dendritic microtubules establishes their nonuniform polarity orientation. *J. Cell Biol.* 130, 93–103.
- Sheng, M., and Hoogenraad, C.C. (2007). The postsynaptic architecture of excitatory synapses: a more quantitative view. *Annu. Rev. Biochem.* 76, 823–847.
- Sillen, A., Barbier, P., Landrieu, I., Lefebvre, S., Wieruszeski, J.-M., Leroy, A., Peyrot, V., and Lippens, G. (2007). NMR investigation of the interaction between the neuronal protein tau and the microtubules. *Biochemistry (Mosc.)* 46, 3055–3064.
- Sj berg, M.K., Shestakova, E., Mansuroglu, Z., Maccioni, R.B., and Bonnefoy, E. (2006). Tau protein binds to pericentromeric DNA: a putative role for nuclear tau in nucleolar organization. *J. Cell Sci.* 119, 2025–2034.
- Skau, C.T., Courson, D.S., Bestul, A.J., Winkelman, J.D., Rock, R.S., Sirotkin, V., and Kovar, D.R. (2011). Actin filament bundling by fimbrin is important for endocytosis, cytokinesis, and polarization in fission yeast. *J. Biol. Chem.* 286, 26964–26977.
- Sloboda, R.D., Dentler, W.L., and Rosenbaum, J.L. (1976). Microtubule-associated proteins and the stimulation of tubulin assembly in vitro. *Biochemistry (Mosc.)* 15, 4497–4505.
- Small, J.V., Stradal, T., Vignal, E., and Rottner, K. (2002). The lamellipodium: where motility begins. *Trends Cell Biol.* 12, 112–120.
- Smith, M.A., Sayre, L.M., Vitek, M.P., Monnier, V.M., and Perry, G. (1995). Early AGEing and Alzheimer’s. *Nature* 374, 316.
- Song, Y.H., and Mandelkow, E. (1993). Recombinant kinesin motor domain binds to beta-tubulin and decorates microtubules with a B surface lattice. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* 90, 1671–1675.
- Song, Y.H., and Mandelkow, E. (1995). The anatomy of flagellar microtubules: polarity, seam, junctions, and lattice. *J. Cell Biol.* 128, 81–94.
- Song, Y., Ori-McKenney, K.M., Zheng, Y., Han, C., Jan, L.Y., and Jan, Y.N. (2012). Regeneration of *Drosophila* sensory neuron axons and dendrites is regulated by the Akt pathway involving Pten and microRNA bantam. *Genes Dev.* 26, 1612–1625.
- Sosa, H., and Milligan, R.A. (1996). Three-dimensional structure of ncd-decorated microtubules obtained by a back-projection method. *J. Mol. Biol.* 260, 743–755.

- Soto, C. (2003). Unfolding the role of protein misfolding in neurodegenerative diseases. *Nat. Rev. Neurosci.* 4, 49–60.
- Spillantini, M.G., and Goedert, M. (2013). Tau pathology and neurodegeneration. *Lancet Neurol.* 12, 609–622.
- Spillantini, M.G., Murrell, J.R., Goedert, M., Farlow, M.R., Klug, A., and Ghetti, B. (1998). Mutation in the tau gene in familial multiple system tauopathy with presenile dementia. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* 95, 7737–7741.
- Stearns, T., and Kirschner, M. (1994). In vitro reconstitution of centrosome assembly and function: the central role of gamma-tubulin. *Cell* 76, 623–637.
- Steffen, W., Karki, S., Vaughan, K.T., Vallee, R.B., Holzbaur, E.L., Weiss, D.G., and Kuznetsov, S.A. (1997). The involvement of the intermediate chain of cytoplasmic dynein in binding the motor complex to membranous organelles of *Xenopus* oocytes. *Mol. Biol. Cell* 8, 2077–2088.
- Su, J.H., Zhao, M., Anderson, A.J., Srinivasan, A., and Cotman, C.W. (2001). Activated caspase-3 expression in Alzheimer's and aged control brain: correlation with Alzheimer pathology. *Brain Res.* 898, 350–357.
- Suei, S., Plastino, J., and Kreplak, L. (2012). Fascin and VASP synergistically increase the Young's modulus of actin comet tails. *J. Struct. Biol.* 177, 40–45.
- Sultan, A., Nesslany, F., Violet, M., Bégard, S., Loyens, A., Talahari, S., Mansuroglu, Z., Marzin, D., Sergeant, N., Humez, S., et al. (2011). Nuclear tau, a key player in neuronal DNA protection. *J. Biol. Chem.* 286, 4566–4575.
- Suozzi, K.C., Wu, X., and Fuchs, E. (2012). Spectraplakins: master orchestrators of cytoskeletal dynamics. *J. Cell Biol.* 197, 465–475.
- Svitkina, T.M., and Borisy, G.G. (1999). Arp2/3 complex and actin depolymerizing factor/cofilin in dendritic organization and treadmilling of actin filament array in lamellipodia. *J. Cell Biol.* 145, 1009–1026.
- Szebenyi, G., Bollati, F., Bisbal, M., Sheridan, S., Faas, L., Wray, R., Haferkamp, S., Nguyen, S., Caceres, A., and Brady, S.T. (2005). Activity-driven dendritic remodeling requires microtubule-associated protein 1A. *Curr. Biol. CB* 15, 1820–1826.
- Tada, T., and Sheng, M. (2006). Molecular mechanisms of dendritic spine morphogenesis. *Curr. Opin. Neurobiol.* 16, 95–101.
- Takei, Y., Kondo, S., Harada, A., Inomata, S., Noda, T., and Hirokawa, N. (1997). Delayed development of nervous system in mice homozygous for disrupted microtubule-associated protein 1B (MAP1B) gene. *J. Cell Biol.* 137, 1615–1626.
- Takei, Y., Teng, J., Harada, A., and Hirokawa, N. (2000). Defects in axonal elongation and neuronal migration in mice with disrupted tau and map1b genes. *J. Cell Biol.* 150, 989–1000.
- Takemura, R., Okabe, S., Umeyama, T., and Hirokawa, N. (1995). Polarity orientation and assembly process of microtubule bundles in nocodazole-treated, MAP2c-transfected COS cells. *Mol. Biol. Cell* 6, 981–996.
- Tanaka, E., and Kirschner, M.W. (1995). The role of microtubules in growth cone turning at substrate boundaries. *J. Cell Biol.* 128, 127–137.
- Tanaka, E.M., and Kirschner, M.W. (1991). Microtubule behavior in the growth cones of living neurons during axon elongation. *J. Cell Biol.* 115, 345–363.
- Tashiro, K., Hasegawa, M., Ihara, Y., and Iwatsubo, T. (1997). Somatodendritic localization of phosphorylated tau in neonatal and adult rat cerebral cortex. *Neuroreport* 8, 2797–2801.
- Tatebayashi, Y., Miyasaka, T., Chui, D.-H., Akagi, T., Mishima, K., Iwasaki, K., Fujiwara, M., Tanemura, K., Murayama, M., Ishiguro, K., et al. (2002). Tau filament formation and associative memory deficit in aged mice expressing mutant (R406W) human tau. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* 99, 13896–13901.
- Teng, J., Takei, Y., Harada, A., Nakata, T., Chen, J., and Hirokawa, N. (2001). Synergistic effects of MAP2 and MAP1B knockout in neuronal migration, dendritic outgrowth, and microtubule organization. *J. Cell Biol.* 155, 65–76.
- Théry, M., Pépin, A., Dressaire, E., Chen, Y., and Bornens, M. (2006). Cell distribution of stress fibres in response to the geometry of the adhesive environment. *Cell Motil. Cytoskeleton* 63, 341–355.
- Thyberg, J., and Moskalewski, S. (1999). Role of microtubules in the organization of the Golgi complex. *Exp. Cell Res.* 246, 263–279.

- Tilney, L.G., Bryan, J., Bush, D.J., Fujiwara, K., Mooseker, M.S., Murphy, D.B., and Snyder, D.H. (1973). Microtubules: evidence for 13 protofilaments. *J. Cell Biol.* 59, 267–275.
- Tögel, M., Wiche, G., and Propst, F. (1998). Novel features of the light chain of microtubule-associated protein MAP1B: microtubule stabilization, self interaction, actin filament binding, and regulation by the heavy chain. *J. Cell Biol.* 143, 695–707.
- Tohgi, H., Utsugisawa, K., Nagane, Y., Yoshimura, M., Ukitsu, M., and Genda, Y. (1999). The methylation status of cytosines in a tau gene promoter region alters with age to downregulate transcriptional activity in human cerebral cortex. *Neurosci. Lett.* 275, 89–92.
- Tournebise, R., Popov, A., Kinoshita, K., Ashford, A.J., Rybina, S., Pozniakovsky, A., Mayer, T.U., Walczak, C.E., Karsenti, E., and Hyman, A.A. (2000). Control of microtubule dynamics by the antagonistic activities of XMAP215 and XKCM1 in *Xenopus* egg extracts. *Nat. Cell Biol.* 2, 13–19.
- Trichet, L., Sykes, C., and Plastino, J. (2008). Relaxing the actin cytoskeleton for adhesion and movement with Ena/VASP. *J. Cell Biol.* 181, 19–25.
- Trinczek, B., Biernat, J., Baumann, K., Mandelkow, E., and Mandelkow, E. (1995a). Domains of Tau Protein, Differential Phosphorylation, and Dynamic Instability of Microtubules. 6, 1887–1902.
- Trinczek, B., Biernat, J., Baumann, K., Mandelkow, E.M., and Mandelkow, E. (1995b). Domains of tau protein, differential phosphorylation, and dynamic instability of microtubules. *Mol. Biol. Cell* 6, 1887–1902.
- Trinczek, B., Ebner, A., Mandelkow, E.M., and Mandelkow, E. (1999). Tau regulates the attachment/detachment but not the speed of motors in microtubule-dependent transport of single vesicles and organelles. *J. Cell Sci.* 112 (Pt 14), 2355–2367.
- Trojanowski, J.Q., and Lee, V.M. (1995). Phosphorylation of paired helical filament tau in Alzheimer's disease neurofibrillary lesions: focusing on phosphatases. *FASEB J. Off. Publ. Fed. Am. Soc. Exp. Biol.* 9, 1570–1576.
- Trojanowski, J.Q., Schuck, T., Schmidt, M.L., and Lee, V.M. (1989). Distribution of tau proteins in the normal human central and peripheral nervous system. *J. Histochem. Cytochem. Off. J. Histochem. Soc.* 37, 209–215.
- Tseng, Y., Kole, T.P., Lee, J.S.H., Fedorov, E., Almo, S.C., Schafer, B.W., and Wirtz, D. (2005). How actin crosslinking and bundling proteins cooperate to generate an enhanced cell mechanical response. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 334, 183–192.
- Tsukada, M., Prokscha, A., Ungewickell, E., and Eichele, G. (2005). Doublecortin association with actin filaments is regulated by neurabin II. *J. Biol. Chem.* 280, 11361–11368.
- Tsvetkov, P.O., Makarov, A.A., Malesinski, S., Peyrot, V., and Devred, F. (2012). New insights into tau-microtubules interaction revealed by isothermal titration calorimetry. *Biochimie* 94, 916–919.
- Tucker, R.P., Garner, C.C., and Matus, A. (1989). In situ localization of microtubule-associated protein mRNA in the developing and adult rat brain. *Neuron* 2, 1245–1256.
- Tulin, A., McClerklin, S., Huang, Y., and Dixit, R. (2012). Single-molecule analysis of the microtubule cross-linking protein MAP65-1 reveals a molecular mechanism for contact-angle-dependent microtubule bundling. *Biophys. J.* 102, 802–809.
- Tyedmers, J., Mogk, A., and Bukau, B. (2010). Cellular strategies for controlling protein aggregation. *Nat. Rev. Mol. Cell Biol.* 11, 777–788.
- Vallee, R.B., Williams, J.C., Varma, D., and Barnhart, L.E. (2004). Dynein: An ancient motor protein involved in multiple modes of transport. *J. Neurobiol.* 58, 189–200.
- Vasquez, R.J., Gard, D.L., and Cassimeris, L. (1999). Phosphorylation by CDK1 regulates XMAP215 function in vitro. *Cell Motil. Cytoskeleton* 43, 310–321.
- Vignjevic, D., Yarar, D., Welch, M.D., Peloquin, J., Svitkina, T., and Borisy, G.G. (2003). Formation of filopodia-like bundles in vitro from a dendritic network. *J. Cell Biol.* 160, 951–962.
- Vignjevic, D., Peloquin, J., and Borisy, G.G. (2006). In vitro assembly of filopodia-like bundles. *Methods Enzymol.* 406, 727–739.
- Violet, M., Delattre, L., Tardivel, M., Sultan, A., Chauderlier, A., Caillierez, R., Talahari, S., Nessler, F., Lefebvre, B., Bonnefoy, E., et al. (2014). A major role for Tau in neuronal DNA and RNA protection in vivo under physiological and hyperthermic conditions. *Front. Cell. Neurosci.* 8, 84.

- Vitre, B., Coquelle, F.M., Heichette, C., Garnier, C., Chrétien, D., and Arnal, I. (2008). EB1 regulates microtubule dynamics and tubulin sheet closure in vitro. *Nat. Cell Biol.* 10, 415–421.
- Vogel, S.K., Petrasek, Z., Heinemann, F., and Schwille, P. (2013). Myosin motors fragment and compact membrane-bound actin filaments. *eLife* 2, e00116.
- De Vrij, F.M., Sluijs, J.A., Gregori, L., Fischer, D.F., Hermens, W.T., Goldgaber, D., Verhaagen, J., Van Leeuwen, F.W., and Hol, E.M. (2001). Mutant ubiquitin expressed in Alzheimer's disease causes neuronal death. *FASEB J. Off. Publ. Fed. Am. Soc. Exp. Biol.* 15, 2680–2688.
- Wachsstock, D.H., Schwartz, W.H., and Pollard, T.D. (1993). Affinity of alpha-actinin for actin determines the structure and mechanical properties of actin filament gels. *Biophys. J.* 65, 205–214.
- Wade, R.H., and Hyman, A.A. (1997). Microtubule structure and dynamics. *Curr. Opin. Cell Biol.* 9, 12–17.
- Wade, R.H., Chrétien, D., and Job, D. (1990). Characterization of microtubule protofilament numbers. How does the surface lattice accommodate? *J. Mol. Biol.* 212, 775–786.
- Walker, R.A., O'Brien, E.T., Pryer, N.K., Soboeiro, M.F., Voter, W.A., Erickson, H.P., and Salmon, E.D. (1988). Dynamic instability of individual microtubules analyzed by video light microscopy: rate constants and transition frequencies. *J. Cell Biol.* 107, 1437–1448.
- Wang, H.-W., and Nogales, E. (2005). Nucleotide-dependent bending flexibility of tubulin regulates microtubule assembly. *Nature* 435, 911–915.
- Wang, L., and Brown, A. (2002). Rapid movement of microtubules in axons. *Curr. Biol. CB* 12, 1496–1501.
- Wang, J.Z., Grundke-Iqbal, I., and Iqbal, K. (1996a). Restoration of biological activity of Alzheimer abnormally phosphorylated tau by dephosphorylation with protein phosphatase-2A, -2B and -1. *Brain Res. Mol. Brain Res.* 38, 200–208.
- Wang, J.Z., Grundke-Iqbal, I., and Iqbal, K. (1996b). Glycosylation of microtubule-associated protein tau: an abnormal posttranslational modification in Alzheimer's disease. *Nat. Med.* 2, 871–875.
- Wang, Y., Garg, S., Mandelkow, E.-M., and Mandelkow, E. (2010). Proteolytic processing of tau. *Biochem. Soc. Trans.* 38, 955–961.
- Wasteneys, G.O. (2002). Microtubule organization in the green kingdom: chaos or self-order? *J. Cell Sci.* 115, 1345–1354.
- Wasteneys, G.O., and Ambrose, J.C. (2009). Spatial organization of plant cortical microtubules: close encounters of the 2D kind. *Trends Cell Biol.* 19, 62–71.
- Watanabe, A., Takio, K., and Ihara, Y. (1999). Deamidation and isoaspartate formation in smeared tau in paired helical filaments. Unusual properties of the microtubule-binding domain of tau. *J. Biol. Chem.* 274, 7368–7378.
- Waterman-Storer, C., Duey, D.Y., Weber, K.L., Keech, J., Cheney, R.E., Salmon, E.D., and Bement, W.M. (2000). Microtubules remodel actomyosin networks in *Xenopus* egg extracts via two mechanisms of F-actin transport. *J. Cell Biol.* 150, 361–376.
- Waterman-Storer, C.M., Worthylake, R.A., Liu, B.P., Burridge, K., and Salmon, E.D. (1999). Microtubule growth activates Rac1 to promote lamellipodial protrusion in fibroblasts. *Nat. Cell Biol.* 1, 45–50.
- Wedemeyer, W.J., Welker, E., and Scheraga, H.A. (2002). Proline cis-trans isomerization and protein folding. *Biochemistry (Mosc.)* 41, 14637–14644.
- Wegner, A. (1976). Head to tail polymerization of actin. *J. Mol. Biol.* 108, 139–150.
- Wei, M.L., and Andreadis, A. (1998). Splicing of a regulated exon reveals additional complexity in the axonal microtubule-associated protein tau. *J. Neurochem.* 70, 1346–1356.
- Wei, Y., Qu, M.-H., Wang, X.-S., Chen, L., Wang, D.-L., Liu, Y., Hua, Q., and He, R.-Q. (2008). Binding to the minor groove of the double-strand, tau protein prevents DNA from damage by peroxidation. *PloS One* 3, e2600.
- Weingarten, M.D., Lockwood, A.H., Hwo, S., and Kirschner, M.W. (1975a). J1t). 72, 1858–1862.
- Weingarten, M.D., Lockwood, A.H., Hwo, S.Y., and Kirschner, M.W. (1975b). A protein factor essential for microtubule assembly. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* 72, 1858–1862.
- Weisshaar, B., Doll, T., and Matus, A. (1992). Reorganisation of the microtubular cytoskeleton by embryonic microtubule-associated protein 2 (MAP2c). *Dev. Camb. Engl.* 116, 1151–1161.
- Welch, M.D., and Mullins, R.D. (2002). Cellular control of actin nucleation. *Annu. Rev. Cell Dev. Biol.* 18, 247–288.

- Wherlock, M., and Mellor, H. (2002). The Rho GTPase family: a Racs to Wrchs story. *J. Cell Sci.* *115*, 239–240.
- Wiche, G. (1998). Role of plectin in cytoskeleton organization and dynamics. *J. Cell Sci.* *111* (Pt 17), 2477–2486.
- Wille, H., Drewes, G., Biernat, J., Mandelkow, E.M., and Mandelkow, E. (1992). Alzheimer-like paired helical filaments and antiparallel dimers formed from microtubule-associated protein tau in vitro. *J. Cell Biol.* *118*, 573–584.
- Witman, G.B., Cleveland, D.W., Weingarten, M.D., and Kirschner, M.W. (1976). Tubulin requires tau for growth onto microtubule initiating sites. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* *73*, 4070–4074.
- Witte, H., Neukirchen, D., and Bradke, F. (2008). Microtubule stabilization specifies initial neuronal polarization. *J. Cell Biol.* *180*, 619–632.
- Wittmann, T., and Waterman-Storer, C.M. (2001). Cell motility: can Rho GTPases and microtubules point the way? *J. Cell Sci.* *114*, 3795–3803.
- Wittmann, T., Bokoch, G.M., and Waterman-Storer, C.M. (2003). Regulation of leading edge microtubule and actin dynamics downstream of Rac1. *J. Cell Biol.* *161*, 845–851.
- Xu, K., Zhong, G., and Zhuang, X. (2013). Actin, spectrin, and associated proteins form a periodic cytoskeletal structure in axons. *Science* *339*, 452–456.
- Yamada, K.M., Spooner, B.S., and Wessells, N.K. (1970). Axon growth: roles of microfilaments and microtubules. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* *66*, 1206–1212.
- Yan, S.D., Chen, X., Schmidt, A.M., Brett, J., Godman, G., Zou, Y.S., Scott, C.W., Caputo, C., Frappier, T., and Smith, M.A. (1994). Glycated tau protein in Alzheimer disease: a mechanism for induction of oxidant stress. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* *91*, 7787–7791.
- Yanagida, T., and Oosawa, F. (1975). Effect of myosin on conformational changes of F-actin in thin filament in vivo induced by calcium ions. *Eur. J. Biochem. FEBS* *56*, 547–556.
- Yang, C., and Svitkina, T. (2011). Visualizing branched actin filaments in lamellipodia by electron tomography. *Nat. Cell Biol.* *13*, 1012–1013; author reply 1013–1014.
- Ydenberg, C.A., Padrick, S.B., Sweeney, M.O., Gandhi, M., Sokolova, O., and Goode, B.L. (2013). GMF severs actin-Arp2/3 complex branch junctions by a cofilin-like mechanism. *Curr. Biol. CB* *23*, 1037–1045.
- Yin, H., and Kuret, J. (2006). C-terminal truncation modulates both nucleation and extension phases of tau fibrillization. *FEBS Lett.* *580*, 211–215.
- Yu, J.-Z., and Rasenick, M.M. (2006). Tau associates with actin in differentiating PC12 cells. *FASEB J. Off. Publ. Fed. Am. Soc. Exp. Biol.* *20*, 1452–1461.
- Yu, W., Cook, C., Sauter, C., Kuriyama, R., Kaplan, P.L., and Baas, P.W. (2000). Depletion of a microtubule-associated motor protein induces the loss of dendritic identity. *J. Neurosci. Off. J. Soc. Neurosci.* *20*, 5782–5791.
- Yu, W., Solowska, J.M., Qiang, L., Karabay, A., Baird, D., and Baas, P.W. (2005). Regulation of microtubule severing by katanin subunits during neuronal development. *J. Neurosci. Off. J. Soc. Neurosci.* *25*, 5573–5583.
- Zhang, R., Alushin, G.M., Brown, A., and Nogales, E. (2015). Mechanistic Origin of Microtubule Dynamic Instability and Its Modulation by EB Proteins. *Cell* *162*, 849–859.
- Zheng, Y., Wong, M.L., Alberts, B., and Mitchison, T. (1995). Nucleation of microtubule assembly by a gamma-tubulin-containing ring complex. *Nature* *378*, 578–583.
- Zhou, F.-Q., Waterman-Storer, C.M., and Cohan, C.S. (2002). Focal loss of actin bundles causes microtubule redistribution and growth cone turning. *J. Cell Biol.* *157*, 839–849.
- Zhou, F.-Q., Zhou, J., Dedhar, S., Wu, Y.-H., and Snider, W.D. (2004). NGF-induced axon growth is mediated by localized inactivation of GSK-3 β and functions of the microtubule plus end binding protein APC. *Neuron* *42*, 897–912.
- Zilka, N., Filipcik, P., Koson, P., Fialova, L., Skrabana, R., Zilkova, M., Rolkova, G., Kontseikova, E., and Novak, M. (2006). Truncated tau from sporadic Alzheimer's disease suffices to drive neurofibrillary degeneration in vivo. *FEBS Lett.* *580*, 3582–3588.
- Zilka, N., Kovacech, B., Barath, P., Kontseikova, E., and Novák, M. (2012). The self-perpetuating tau truncation circle. *Biochem. Soc. Trans.* *40*, 681–686.

Annexes

Annexe 1

Méthodes des expériences de biologie cellulaire présentées en résultats complémentaires

I- Culture cellulaire, immunofluorescence et quantification des faisceaux de microtubules dans les cellules COS-7

Les anticorps primaires utilisés pour l'immunofluorescence sont des anticorps polyclonaux de lapins anti-GFP pour tau et un anticorps monoclonal anti- α tubuline (Peris et al, 2006). Les anticorps secondaires sont couplés aux fluorophores Alexa-488 ou -565 (Jackson Immuno-Research Laboratories).

Les cellules COS-7 sont transfectées avec le kit Exgen lorsqu'elles arrivent à confluence. Au bout de 24 h, elles sont fixées dans 0,5 % de glutaraldéhyde dilué dans du tampon CBS (10 mM MES, 138 mM KCl, 3 mM $MgCl_2$, 2 mM EGTA, 10% sucrose, 0,1% Triton X-100) pendant 10 min à 37°C. Les cellules fixées sont rincées dans du CB (CBS sans triton) et l'auto-fluorescence du glutaraldéhyde est éteinte avec 1 mg/mL de $NaBH_4$ dans du PBS pendant 10 min à température ambiante. Les cellules sont ensuite rincées dans du PBS, du PBS-0,1% Tween 20 puis sont immuno-marquées pour la tubuline endogène et tau surexprimée. Les images fluorescentes sont acquises à l'objectif 63X (NA 1,4) avec un microscope confocal Zeiss LSM 710 et le logiciel ZEN 2010 (Carl Zeiss MicroImaging).

La macro pour déterminer la quantité de faisceaux de microtubules par cellule transfectée fait un blur pour récupérer les cellules transfectées puis binarise l'image. Elle fait ensuite une carte de distance pour segmenter les microtubules puis une érosion pour récupérer les faisceaux. Une autre carte de distance est faite pour récupérer l'ensemble des microtubules. On obtient deux masques (un représentant la totalité des microtubules et l'autre les microtubules en faisceaux) avec une valeur de surface pour chacun.

II- Culture cellulaire, immunofluorescence et FRET (Fluorescence Resonance Energy Transfer) par photo-blanchiment de l'accepteur (FRET-AB) dans les cultures primaires de neurones

Les anticorps primaires utilisés pour l'immunofluorescence sont des anticorps polyclonaux de lapins (A0024, Dakocytomation, Danemark) et un anticorps monoclonal anti- α tubuline (Peris et al, 2006). Les anticorps secondaires sont couplés aux fluorophores Alexa-488 ou -647 (Jackson Immuno-Research Laboratories). La phalloïdine-ATTO-565 provient de ATTO-TEC GmbH (Allemagne).

Les hippocampes d'embryons de souris (E18) sont digérés avec 0,25 % de trypsine dans du HBSS (Hanks' balanced salt solution : 5,3 mM KCl, 0,44 mM KH_2PO_4 , 137,9 mM NaCl, 0,34 mM NaH_2PO_4 , 5,56 mM glucose, Invitrogen, France) à 37°C pendant 15 min. Après dissociation manuelle, les cellules sont étalées à une concentration de 5000 à 15000 cellules/cm² sur des lamelles couvertes de poly-L-lysine et incubées dans du DMEM-10% Horse Serum. Le milieu est remplacé 2 h après par milieu Neurobasal supplémenté avec du B-27 (Invitrogen, France). Deux jours après l'étalement (2 DIV), les neurones sont fixés dans 0,5 % de glutaraldéhyde dilué dans du tampon CBS (10 mM MES, 138 mM KCl, 3 mM MgCl_2 , 2 mM EGTA, 10% sucrose, 0,1% Triton X-100) pendant 10 min à 37°C. Les cellules fixées sont rincées dans du PBS, et l'auto-fluorescence du glutaraldéhyde est éteinte avec 1 mg/mL de NaBH_4 dans du PBS pendant 10 min à température ambiante. Les cellules sont ensuite rincées dans du PBS, du PBS-0,1% Tween 20 puis sont immuno-marquées pour la tubuline et tau endogènes. Les filaments d'actine sont marqués avec la phalloïdine-ATTO-565 pendant l'incubation avec les anticorps secondaires. Les images fluorescentes sont acquises à l'objectif 63X (NA 1,4) avec un microscope confocal Zeiss LSM 710 et le logiciel ZEN 2010 (Carl Zeiss MicroImaging).

Le FRET par extinction de l'accepteur (FRET-AB) est réalisé sur des neurones à 2 DIV fixés de la même manière que décrit précédemment. Tau est révélé avec un anticorps primaire polyclonal et un anticorps secondaire Alexa-488 (donneur de fluorescence). L'actine est marquée avec la phalloïdine-ATTO-565 (accepteur de fluorescence). Pour l'extinction de l'accepteur, des régions d'intérêt (ROI) correspondant aux cônes de croissance sont exposées pendant 5 scans par le laser émettant à 561 nm à puissance maximale en utilisant le microscope confocal LSM 710. La totalité du neurone est imagée à faible intensité avant et après l'extinction de l'accepteur. L'efficacité du FRET est calculée à partir de l'augmentation

de l'intensité de fluorescence du donneur après que l'accepteur a été sélectivement éteint (Grecco et Bastiaens, 2013). L'évolution de l'intensité de fluorescence de ROI non photo-éteintes dans le corps cellulaires ou d'autres cônes de croissance du même neurone est également contrôlée.

Annexe 2

Activity-dependent tau protein translocation to excitatory synapse is disrupted by exposure to amyloid-beta oligomers.

Au cours de ma thèse, j'ai également participé à une étude en collaboration avec l'équipe d'Alain Buisson. Cette équipe a démontré une translocation de tau dans les épines dendritiques lors de l'activation de la transmission synaptique de neurones matures. Des expériences de co-immunoprécipitation ont également montré que tau interagit avec l'actine filamenteuse des synapses. En conditions pathologiques (exposition à des oligomères d'A β), la translocation synaptique de tau induite par l'activation neuronale est perdue. L'ensemble de ces résultats suggère un rôle de tau dans la transmission synaptique via une régulation du cytosquelette d'actine des épines. Mon rôle dans cette étude a été de mettre en évidence la liaison directe de tau avec l'actine ainsi que l'effet de tau sur la formation de faisceaux d'actine par des approches biochimiques de co-sédimentation en système purifié.

Activity-Dependent Tau Protein Translocation to Excitatory Synapse Is Disrupted by Exposure to Amyloid-Beta Oligomers

Marie Lise Frandemiche,^{1,2} Sandrine De Seranno,^{1,2} Travis Rush,^{1,2} Eve Borel,^{1,2} Auréliane Elie,^{1,2} Isabelle Arnal,^{1,2} Fabien Lanté,^{1,2} and Alain Buisson^{1,2}

¹INSERM, U836, BP 170, and ²Université Joseph Fourier, Grenoble Institut des Neurosciences, BP 170, Grenoble Cedex 9, F-38042, France

Tau is a microtubule-associated protein well known for its stabilization of microtubules in axons. Recently, it has emerged that tau participates in synaptic function as part of the molecular pathway leading to amyloid-beta ($A\beta$)-driven synaptotoxicity in the context of Alzheimer's disease. Here, we report the implication of tau in the profound functional synaptic modification associated with synaptic plasticity. By exposing murine cultured cortical neurons to a pharmacological synaptic activation, we induced translocation of endogenous tau from the dendritic to the postsynaptic compartment. We observed similar tau translocation to the postsynaptic fraction in acute hippocampal slices subjected to long-term potentiation. When we performed live confocal microscopy on cortical neurons transfected with human-tau-GFP, we visualized an activity-dependent accumulation of tau in the postsynaptic density. Coprecipitation using phalloidin revealed that tau interacts with the most predominant cytoskeletal component present, filamentous actin. Finally, when we exposed cortical cultures to 100 nM human synthetic $A\beta$ oligomers ($A\beta$ o's) for 15 min, we induced mislocalization of tau into the spines under resting conditions and abrogated subsequent activity-dependent synaptic tau translocation. These changes in synaptic tau dynamics may rely on a difference between physiological and pathological phosphorylation of tau. Together, these results suggest that intense synaptic activity drives tau to the postsynaptic density of excitatory synapses and that $A\beta$ o-driven tau translocation to the spine deserves further investigation as a key event toward synaptotoxicity in neurodegenerative diseases.

Key words: amyloid-beta oligomers; excitatory synapses; LTP; phosphorylation; synaptic plasticity; tau

Introduction

Fibrillar deposits of phosphorylated tau are a characteristic feature of several neurodegenerative diseases, including Alzheimer's disease (AD). Increasing evidence suggests that the presence of neurofibrillary tangles does not cause direct neuronal dysfunction, but rather alterations to physiological tau functions may be key to disease processes (for review, see Jaworski et al., 2010; Morris et al., 2011). Tau is a highly soluble protein with a predominant expression in neurons (Trojanowski et al., 1989). A large proportion of tau is in the axon, where it interacts with microtubules (MTs) through its C-terminal microtubule-binding domain to promote MT polymerization and stabiliza-

tion (for review, see Götz et al., 2013). Accordingly, tau exerts a critical role in the regulation of microtubule-dependent axonal transport. More recently, numerous studies have revealed novel functions for tau, including in neuronal signaling pathways, DNA protection, and synaptic regulation. These studies were based on the identification of tau interaction with novel molecular partners such as DNA or RNA (Loomis et al., 1990; Sultan et al., 2011), neuronal membranes (Pooler et al., 2012), and synaptic located proteins such as Fyn or PSD-95 (Ittner et al., 2010; Mondragón-Rodríguez et al., 2012). Subsequently, the association of tau with synaptic proteins has raised the intriguing possibility that tau exerts physiological roles in the synapse and that altered tau function may be involved in the synaptic dysfunction that precedes synaptic loss common across neurodegenerative tauopathies.

Although postsynaptic localization of tau was initially identified under pathological conditions (Hoover et al., 2010), there are several lines of evidence suggesting the involvement of tau in physiological synaptic functions. In 2010, Ittner et al. showed that the presence of tau in the postsynaptic compartment mediates the targeting of the src family kinase fyn to glutamatergic NMDA receptors. More recently, Chen et al. (2012) suggested that tau participates in spine edification by demonstrating that reduction of tau expression results in synapse loss. Together, these data are consistent with a functional

Received Oct. 3, 2013; revised March 19, 2014; accepted March 25, 2014.

Author contributions: M.L.F., S.D.S., T.R., A.E., I.A., F.L., and A.B. designed research; M.L.F., S.D.S., T.R., E.B., A.E., I.A., F.L., and A.B. performed research; M.L.F., S.D.S., T.R., E.B., A.E., I.A., F.L., and A.B. contributed unpublished reagents/analytic tools; M.L.F., S.D.S., T.R., A.E., I.A., F.L., and A.B. analyzed data; M.L.F., S.D.S., T.R., A.E., I.A., F.L., and A.B. wrote the paper.

This work was supported by the Fondation Neurodis, INSERM, and the Centre National de la Recherche Scientifique joint ATIP-Avenir program and the Agence Nationale de la Recherche (ANR MALAD program). A.E. is supported by a grant from the Région Rhône-Alpes (program CIBLE 2011). We thank N. Sergeant (Lille, France) for providing us with His-tagged human tau plasmid.

The authors declare no competing financial interests.

Correspondence should be addressed to Alain Buisson, Inserm U836, GIN, BP 170, Grenoble Cedex 9, 38042, France. E-mail: alain.buisson@ujf-grenoble.fr.

DOI:10.1523/JNEUROSCI.4261-13.2014

Copyright © 2014 the authors 0270-6474/14/346084-14\$15.00/0

role for tau in the physiological activation of excitatory synapses.

Dendritic spines are small protuberances observed on the dendrites that are the physical support of postsynaptic sites of excitatory synapses. They are enriched in neurotransmitter receptors, specific scaffolding proteins, and display an abundant actin cytoskeleton responsible for spine morphology (for review, see Hotulainen and Hoogenraad, 2010). Under specific activation patterns, spines undergo profound and long-lasting modifications of morphology and synaptic strength that together underlie synaptic plasticity. Synaptic dysfunction is the best correlate of the cognitive decline that characterizes AD, and tau has been implicated in this synaptotoxic effect triggered by amyloid-beta ($A\beta$) oligomer exposure. With the emergent idea that tau could penetrate into the synaptic compartment, we investigated the mechanisms of tau recruitment to the spines under synaptic activation and $A\beta$ exposure. To monitor tau localization, we used subcellular fractionation of both *ex vivo* (i.e., acute hippocampal slices) and *in vitro* (i.e., cultured cortical neurons) subjected to an electrophysiological or chemical long-term potentiation (LTP). In parallel, we monitored GFP-tagged tau coupled with dynamic fluorescence imaging.

Materials and Methods

Primary cultures of cortical neurons. Mouse cortical neurons were cultured from 14- to 15-d-old OF1 embryos as described previously (Léveillé et al., 2008). Cerebral cortices were dissected, dissociated, and cultured in Dulbecco's modified Eagle's medium containing 5% fetal bovine serum, 5% horse serum, and 2 mM glutamine (all from Sigma) on 24-well plates (Falcon; Becton Dickinson) for biochemical experiments. Neurons were seeded on 35 mm glass-bottom dishes (MatTek) at a final concentration of two cortical hemispheres per dish for confocal experiments. All plates, dishes, and coverslips were coated with 0.1 mg/ml poly-D-lysine and 0.02 mg/ml laminin (Sigma). Cultures were maintained at 37°C in a humidified atmosphere containing 5% CO_2 /95% air. After 3–4 d *in vitro* (DIV), cytosine arabinoside (AraC, 10 μ M; Sigma) was added to inhibit proliferation of non-neuronal cells in cultures used for biochemistry experiments; 98% of the cells were considered as neuronal. The day before the experiments, cells were washed in DMEM. Treatments were performed on neuronal cultures at 14–15 DIV.

Neuronal transfection. Transfections were performed on cortical neuron cultures after 12 DIV with calcium phosphate precipitation. Growth medium (DMEM and sera) was removed and kept until the last step of transfection. Cells were washed for 1–1.5 h in DMKY buffer containing the following (in mM): 1 kynurenic acid, 0.9 NaOH, 0.5 HEPES, 10 $MgCl_2$, plus phenol red 0.05%, pH 7.4. Then, 3.5 μ g of the plasmids pEGFP-Tau 2N4R (full-length human nervous system tau) and LifeAct-RFP, a peptide that specifically interacts with filamentous actin (Riedl et al., 2008), were mixed with $CaCl_2$ (120 mM) in HBS containing the following (in mM): 25 HEPES, 140 NaCl, and 0.750 Na_2HPO_4 , pH 7.06 and left for 20 min to precipitate the DNA. Plasmids were then applied to cells for 30 min. Transfection medium was replaced with conditioned growth medium and cultures were returned to the incubator until use at DIV 14–15.

Mutagenesis. Point mutations were performed on pEGFP-Tau 2N4R (full-length human nervous system tau) using the QuikChange kit from Agilent Technologies.

Fluorescence recovery after photobleaching experiments. Fluorescence recovery after photobleaching (FRAP) was performed on cultured neurons 48 h after transfection. Images were acquired with an inverted Nikon Eclipse Ti C2 confocal microscope with a Nikon 60 $\times$ water objective with a 1.33 numerical aperture. EGFP-tau was bleached at 405 nm and the fluorescence recovery was measured for 80 s (at 1 s/frame). Fluorescent signal analysis was performed with the Nikon software Nis.

Time-lapse imaging of transfected neurons. Transfected neurons were placed in HBBSS solution containing the following (in mM): 0.110 NaCl,

0.005 KCl, 2 $CaCl_2$, 0.0008 $MgSO_4$, NaH_2PO_4 1 NaH_2PO_4 , 12 HEPES, 5 D-glucose, 25 $NaHCO_3$, and 0.01 glycine (all from Sigma) 1.5–2 h before experiments. Neurons were imaged with a Zeiss LSM 710 confocal imaging system using a 63 $\times$ oil-immersion objective and ZEN 2010 software. Z-stacks were 0.61 μ m per step (1 pixel = 0.134 μ m) with a 1 AU pinhole at 84 μ m. Images were collected immediately before and 15 and 30 min after treatment. Evolution of the fluorescence within spine heads in maximum projection was analyzed with MetaMorph software (Molecular Devices). A total of 20–40 spines per neurons were followed throughout treatment for each experiment.

Slice preparation. Hippocampal slices were prepared from 2- to 4-month-old male OF1 mice. Mice were cervically dislocated and immediately decapitated. Their hippocampi were dissected out and 400- μ m-thick transverse slices were cut in ice-cold cutting solution containing the following (in mM): 2.5 KCl, 1.25 NaH_2PO_4 , 10 $MgSO_4$, 0.5 $CaCl_2$, 26 $NaHCO_3$, 234 sucrose, and 11 glucose, saturated with 95% O_2 and 5% CO_2 with a Leica VT1200 blade microtome. After the dissection, slices were kept in oxygenated artificial CSF (ACSF) containing the following (in mM): 119 NaCl, 2.5 KCl, 1.25 NaH_2PO_4 , 1.3 $MgSO_4$, 2.5 $CaCl_2$, 26 $NaHCO_3$, and 11 glucose 11 at a temperature of $27 \pm 1^\circ C$ for at least 1 h.

Electrophysiology recordings. Slices were visualized in a chamber on an upright microscope with transmitted illumination and continuously perfused at 1 ml/min with the same oxygenated ACSF at $27 \pm 1^\circ C$. Stimulating electrodes (bipolar microelectrodes) were placed in the stratum radiatum to stimulate the Schaffer collaterals pathway. Field EPSPs (fEPSPs) were recorded in the stratum radiatum using a recording glass pipette filled with ACSF and amplified with an Axon Axopatch 200B amplifier (Molecular Devices). Data were digitized through an Axon Digidata 1440A and acquired with pCLAMP 10 software (Molecular Devices). The initial slope of the fEPSPs was measured to avoid population spike contamination. For LTP experiments, test stimuli (0.2 ms pulse width) were delivered once every 15 s and the stimulus intensity was set to give baseline fEPSP slopes that were 50% of maximal evoked slopes.

Slices that showed maximal fEPSP sizes <1 mV were rejected. LTP was induced by applying 4 trains of 100 stimuli at 100 Hz with an intertrain interval of 5 min. CA1 slices were frozen in liquid nitrogen at the end of experiment for subsequent biochemical analyses.

Purification of tau. His-tagged human Tau (1N4R Tau-412 isoform) plasmid was kindly provided by Dr. N. Sergeant (Lille, France). Recombinant Tau was purified from *E. coli* BL21 (Invitrogen) on Talon metal affinity resin (Clontech) according to the manufacturer's instructions. The protein was further processed by a size exclusion chromatography in BRB80 buffer containing the following (in mM): 80 Pipes, 1 EGTA, and 1 $MgCl_2$, pH 6.8, concentrated, and ultracentrifuged at $230,000 \times g$ for 10 min. The protein was frozen in liquid nitrogen and stored at $-80^\circ C$. Protein concentrations were determined by a Bradford assay (Sigma) using BSA as a standard.

In vitro cosedimentation assays. Actin cosedimentation assays were performed with purified human platelet actin (Cytoskeleton) resuspended in buffer G containing the following (in mM): 2 Tris, pH 8.0, 0.2 ATP, 0.5 DTT, and 0.1 $CaCl_2$. Then, 5 μ M G-actin was polymerized for 1 h at room temperature in the absence or in the presence of 1 μ M Tau in buffer G containing the following (in mM): 50 KCl, 1 $MgCl_2$, 1 EGTA, and 10 imidazole, pH 7.5. The 20 μ l reaction mixtures were then centrifuged either for 15 min at $100,000 \times g$ or for 10 min at $15,000 \times g$. At low-speed centrifugation, filamentous actin remains in the supernatant and only filamentous actin (F-actin) bundles are pelleted, whereas the high-speed centrifugation precipitates all F-actin forms. Supernatants and pellets fractions were recovered and subjected to 10% SDS-PAGE gel, followed by Coomassie blue staining.

Subcellular fractionation. Cultured neurons or hippocampal CA1 slices were homogenized in cold buffer containing 0.32 M sucrose and 10 mM HEPES, pH 7.4. Samples were maintained at $4^\circ C$ during all steps of the experiment. Homogenates were cleared at $1000 \times g$ for 10 min to remove nuclei and large debris. The resulting supernatants were concentrated at $12,000 \times g$ for 20 min to obtain a crude membrane fraction, which was then resuspended twice (4 mM HEPES, 1 mM EDTA, pH 7.4, 20 min at

12,000 $\times$ g). Then, the pellet was incubated (20 mM HEPES, 100 mM NaCl, 0.5% Triton X-100, pH 7.2) for 1 h at 4°C with mild agitation and centrifuged at 12,000 $\times$ g for 20 min to pellet the synaptosomal membrane fraction. The supernatant was collected as the non-postsynaptic density membrane fraction (non-PSD) or Triton-soluble fraction. The pellet was then solubilized (20 mM HEPES, 0.15 mM NaCl, 1% Triton X-100, 1% deoxycholic acid, 1% SDS, pH 7.5) for 1 h at 4°C and centrifuged at 10,000 $\times$ g for 15 min. The supernatant contained the PSD or Triton-insoluble fraction. The integrity of non-PSD was verified by immunoblotting for synaptophysin, which was enriched in the non-PSD fraction, and the PSD fraction was confirmed by the immunoblotting of PSD-95 enriched in this compartment.

A β oligomerization and fibrillogenesis. Recombinant A β 1–42 peptide (Bachem) was resuspended in 1,1,1,3,3,3-hexafluoro-2-propanol (HFIP) to 1 mM until complete resuspension as described previously (Stine et al., 2003). A β ’s were prepared by diluting A β to 1 mM in DMSO and then to 100 μ M in ice-cold HEPES and bicarbonate-buffered saline solution (HBBSS) with immediate vortexing and bath sonication, and then incubated at 4°C for 24 h with mild agitation.

Synaptic activation and actin cytoskeleton disruption. Cultures were placed in DMEM 24 h before the experiment. Synaptic activation was induced at 37°C with 50 μ M bicuculline (Bic), a GABA_A receptor antagonist, and 2.5 mM 4-amino-pyridine, a weak potassium channel blocker (all from Tocris Bioscience) for 15 min (Léveillé et al., 2008). Actin stabilization was induced by jasplakinolide (Santa Cruz Biotechnology) application at 1 μ M (Lazaro-Díez et al., 2008).

Immunoprecipitation. After treatment, primary neurons were rapidly transferred on ice to remove the media and immediately extracted with fresh buffer (100 mM Na₂HPO₄, 100 mM NaH₂PO₄, pH 7.2, 2 mM ATP, 2 mM MgCl₂, phosphatase, and protease inhibitor mixture; Sigma). Equal amounts of protein were incubated with biotin-XX-phalloidin (Molecular Probes) 0.45 unit/condition with gentle rocking for 1 h at room temperature. Thereafter, Dynabeads M-280 Streptavidin (Invitrogen) were added to the complex formed by filamentous actin-biotin-XX-phalloidin and incubated for 30 min at room temperature using gentle rotation. The actin-coated beads were separated with a magnet for 2–3 min, washed several times in the buffer, and boiled in 1 $\times$ loading buffer containing 124 mM Tris, 2% SDS, 10% glycerol, 1% β -mercaptoethanol, and 1% bromophenol blue for 5 min. Samples were stored at –20°C until used.

Immunoblotting. Samples in loading buffer were boiled for 5 min and equal amounts of proteins (5–10 μ g) were resolved on a 4–12% or 4–20% gradient Bis-Tris polyacrylamide precast gels (Bio-Rad) in denaturing conditions. Proteins were transferred to a polyvinylidene difluoride membrane (Millipore) for 2 h at 4°C. Membranes were blocked with Tris-buffered saline (10 mM Tris, 150 mM NaCl, pH 7.4) containing 0.01% Tween 20 and 5% nonfat dry milk for 1 h at room temperature. Membranes were then incubated overnight at 4°C with the primary antibodies tau (1:50,000 dilution, A0024; Dako); tau phospho serine 404 and tau phospho tyrosine 205 (1:1000 dilution, PA1–14422, PA1–14426, PA1–14415; Thermo Scientific); actin (1:2000, A2066, Sigma); GluA1, GluN2B, GluN2A, and synaptophysin (1:1000 dilution, A1504, MAB5778, 04–901, MAB368; Millipore); Fyn (1:500 dilution, 15-sc-434; Santa Cruz Biotechnology); and PSD-95 (1:1000 dilution, clone 6G6–1C9 ab2723; Abcam). Membranes were incubated with the HRP-conjugated secondary antibodies rabbit (1:40,000) and mouse (1:5000) (both from Sigma) for 45 min at room temperature. Specific proteins were visualized with an enhanced chemiluminescence ECL Detection System (Bio-Rad). Chemiluminescence detections were performed with the Bio-Rad Chemidoc system and analyzed with the software Imagemagelab (Bio-Rad).

Statistics. Results are expressed as the mean $\pm$ SEM from independent biological samples. Statistical analyses were performed with GraphPad Prism 6.0 software by two-way ANOVA followed by Bonferroni’s test for confocal analysis, one-way ANOVA for phalloidin precipitation analysis, and Student’s *t* test for Western blot analysis.

Results

Axonal and dendritic localization of tau in primary cortical neurons under resting conditions

To characterize the localization of tau in cultured neurons under resting conditions (14 DIV), we transfected full-length tau 2N4R-EGFP and LifeAct-RFP, the latter of which encodes a small, 17 aa peptide that binds specifically to filamentous actin (Riedl et al., 2008). In neurons, filamentous actin is known to be enriched to the synaptic compartment (Star et al., 2002). By using LifeAct-RFP instead of actin-GFP, we maintained actin stoichiometry. We first verified the localization of LifeAct-RFP in the synaptic compartment by cotransfecting a synaptic scaffold protein, PSD-95-YFP. The merged image showed that filamentous actin and PSD-95 are both localized in dendritic spines (Fig. 1A). We then cotransfected LifeAct-RFP with EGFP-tau in cortical neurons and observed that EGFP-tau fluorescence is restricted to axonal and dendritic shafts in the resting condition (Fig. 1B). Only a minimal number of spines displayed traces of EGFP-tau (Fig. 1B).

Synaptic activation induces translocation of tau to the synaptic compartment

To determine how and under which circumstances tau enters into the postsynaptic compartment, we monitored EGFP-tau fluorescence under various conditions. First, we induced a long-lasting synaptic activation by exposing cultured cortical neurons to Bic (50 μ M), a GABAergic antagonist, in the presence of 4-aminopyridine (4-AP, 2.5 mM), a weak potassium channel blocker that prevents neuronal repolarization (Léveillé et al., 2008), for 30 min (Fig. 2A). In control conditions, EGFP-tau showed a weak but detectable fluorescence in >60% of the spine, but the calculation mode used to quantify the imaging data ($\Delta F/F_0$) brings our quantification to zero to highlight changes from base line fluorescence. As early as 15 min after the beginning of the treatment, we measured an increase in EGFP-tau fluorescence in dendritic spines from 0 ± 0.04 to 0.52 ± 0.06 , which stabilized after 30 min to 0.64 ± 0.05 ($***p < 0.0001$, 2-way ANOVA; Bic/4-AP: $n = 5$, $N = 162$ spines; control $n = 3$, $N = 40$ spines; Fig. 2B) and colocalized with LifeAct-RFP fluorescence. In contrast, the evolution of EGFP-tau fluorescence during a 30 min vehicle application showed no detectable change (Fig. 2B). Recognizing that plasmid-driven expression of EGFP-tau may modify tau cellular distribution, we studied the localization of endogenous tau in neurons subjected to synaptic activation. For this study, we use a primary cortical cultures system at a density that permits biochemical analysis but also renders immunohistochemistry impractical because it is very difficult to distinguish individual immunostained spines. Western blot analysis of tau from total neuronal lysate showed no change after 15 and 30 min Bic/4-AP application (Fig. 2C). Then, we isolated the non-PSD fraction (i.e., Triton-soluble fraction) from the PSD-enriched fraction (i.e., Triton-insoluble fraction) and audited the presence of synaptophysin and PSD-95 in each to verify the fractionation protocol. As expected, synaptophysin appeared only in the non-PSD fraction and PSD-95 only in the PSD-enriched fraction. Next, we performed Western blot analysis of several synaptic proteins to assess the effect of our stimulation protocol (Fig. 2D). No change in tau expression was detected in the non-PSD fraction. In contrast, tau expression in the PSD fraction showed a small amount in resting conditions, which increased 1.5-fold after 15 min of synaptic activation ($***p < 0.0001$, 2-tailed Student’s *t* test; control 20.62 ± 1.235 vs Bic/4-AP 30.92 ± 1.799 , $N = 13$ independent cultures; Fig. 2E). On the same PSD-positive

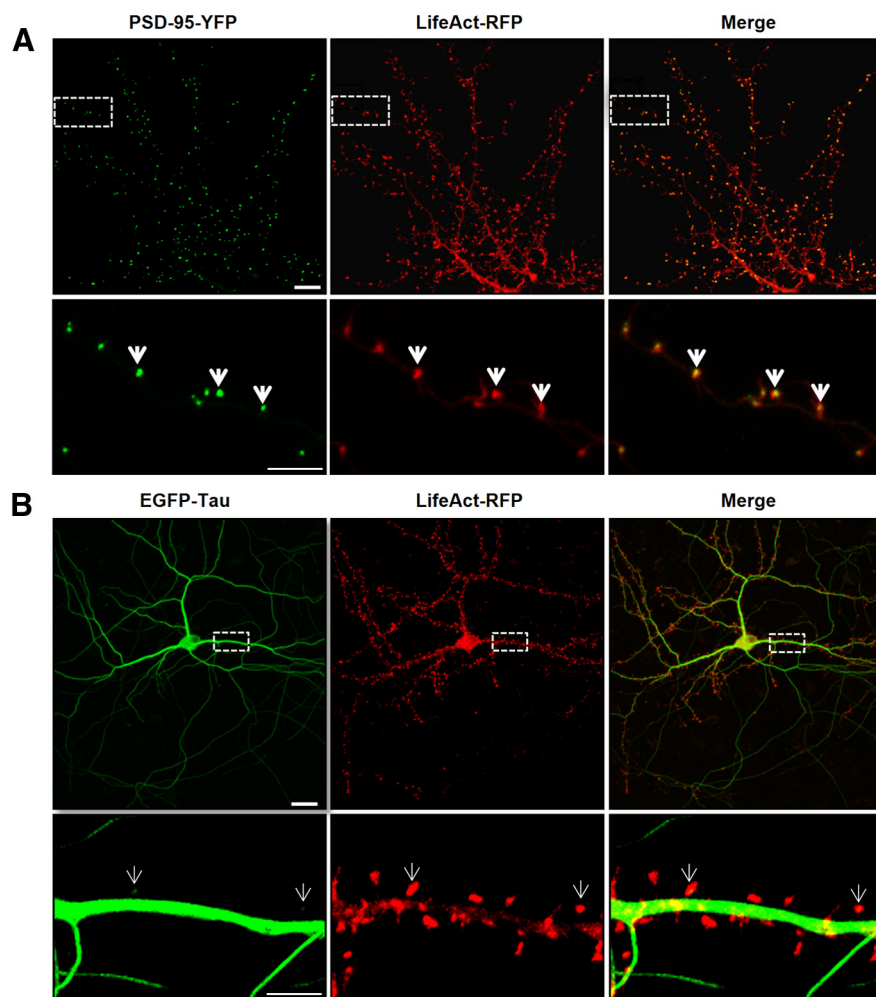


Figure 1. LifeAct colocalizes with PSD-95-YFP in dendritic spines and displays a limited colocalization with EGFP-Tau. **A**, Confocal imaging of dendritic spines of primary murine cortical neuronal cultures (14 DIV) cotransfected with LifeAct-RFP and PSD-95-YFP 48 h before imaging. Merge images show the colocalization (yellow, white arrows) of PSD-95 and filamentous actin in dendritic spines. **B**, Dendritic spines of cortical neuron culture cotransfected with LifeAct-RFP and EGFP-Tau. Merged images show only limited colocalization of EGFP-Tau in the indicated dendritic spines (white arrows). Scale bars: top, 10 μ m; bottom, 5 μ m.

fractions, we analyzed the variation of synaptic markers that have been identified as potential tau-interacting partners (Lee et al., 1998; Ittner et al., 2010; Mondragón-Rodríguez et al., 2012). After synaptic activation, we detected increases in PSD-95 ($*p = 0.0249$, 2-tailed Student's *t* test; control 19.10 ± 2.557 vs Bic/4-AP 26.9 ± 1.894 , $N = 9$; Fig. 2E) and the src family tyrosine kinase Fyn ($**p = 0.0023$, 2-tailed Student's *t* test; control 19.42 ± 1.337 vs Bic/4-AP 26.54 ± 1.130 , $N = 6$; Fig. 2E). The AMPA receptor subunit GluA1, which is recruited to the membrane during synaptic plasticity (Malinow and Malenka, 2002), was also increased in the PSD fraction ($**p = 0.0026$, 2-tailed Student's *t* test; control 1884 ± 1930 vs Bic/4-AP 2863 ± 1.95 , $N = 9$; Fig. 2E). The actin cytoskeleton is highly reorganized during synaptic activation, as described previously (Star et al., 2002). Here, we saw an increase in actin content restricted to the PSD fraction ($*p = 0.0101$, 2-tailed Student's *t* test; control 22.18 ± 1.913 vs Bic/4-AP 29.62 ± 1.517 , $N = 7$ independent cultures; Fig. 2E). Therefore, during a long-lasting synaptic activation, we observed an increase in tau, fyn, actin, GluA1, and PSD-95 content in the PSD-positive fraction, which is consistent with the characteristic features of synaptic plasticity (Ehlers, 2003). These results suggest that tau translocates from the den-

drotic shaft to the synapse during activation and probably takes part in the activity-driven synaptic reorganization that underlies synaptic plasticity. To generalize these findings, we chose to confirm these results in an *ex vivo* model of synaptic plasticity: LTP in hippocampal slices (Fig. 3A). We performed synaptosomal fractionation of microdissected CA1 regions taken from potentiated hippocampal slices. We observed a similar LTP-induced increase in tau content within the PSD-enriched fraction from CA1 synaptosomes (29.86 ± 4.86 to 70.15 ± 4.86 , $**p = 0.0011$; Fig. 3B). As expected, actin and GluA1 were also increased, strengthening the idea that tau is involved in synaptic reorganization processes necessary for synaptic plasticity (34.31 ± 2.518 to 64.92 ± 2.518 , $***p = 0.0002$; 34.31 ± 8.15 to 65.70 ± 8.15 , $*p = 0.0346$; Fig. 3C).

Tau interacts with filamentous actin in the synapse

Although it was initially described as a microtubule-associated protein (MAP), tau has been shown to interact with other molecular partners in the PSD fraction, such as fyn or PSD-95 (Ittner et al., 2010; Mondragón-Rodríguez et al., 2012). Among several synaptically located proteins, actin is of particular interest for its potential capacity to interact with human tau (Fulga et al., 2006; Yu and Rasenick, 2006; He et al., 2009). We investigated whether tau interacts with actin, the most predominant cytoskeleton element of the synapse. Purified G-actin was polymerized with the 1N4R tau isoform and centrifuged at $100,000 \times g$ (Fig. 4A) or $15,000 \times g$ (Fig. 4B). Although tau alone

were observed only in the supernatant in both experimental conditions, ruling out a nonspecific coaggregation, we found that tau coprecipitated with the pellet obtained from high- and low-speed centrifugation, illustrating its direct interaction with both F-actin (Fig. 4A) and actin bundles (Fig. 4B). It is worth noting that the filamentous nature of actin in the presence of tau was confirmed by electron cryomicroscopy (data not shown). We also performed transfection with 1N4R-GFP and we observed similar synaptic-activity-dependent translocation as observed with the full-length tau (Fig. 4C). Similarly, a phalloidin precipitation of neuronal lysate that selectively collected the neuronal F-actin and its binding partners revealed the presence of tau by Western blotting. This result illustrates that tau interacts with F-actin in neurons (Fig. 5A). After synaptic activation, we observed an increase in the amount of F-actin harvested ($***p = 0.0003$, 2-tailed Student's *t* test; control 17.67 ± 2.08 ; Bic/4-AP 31.76 ± 1.882 , $N = 7$ independent cultures; Fig. 5B) and a concomitant increase in tau ($***p = 0.0002$, control 16.91 ± 1.843 ; Bic/4-AP 31.49 ± 2.028 , $N = 7$ independent cultures). These results show that the amount of tau collected is proportional to neuronal F-actin content, suggesting a close link between F-actin and tau. Next, we studied the impact of pharmacological manipulations of actin organization

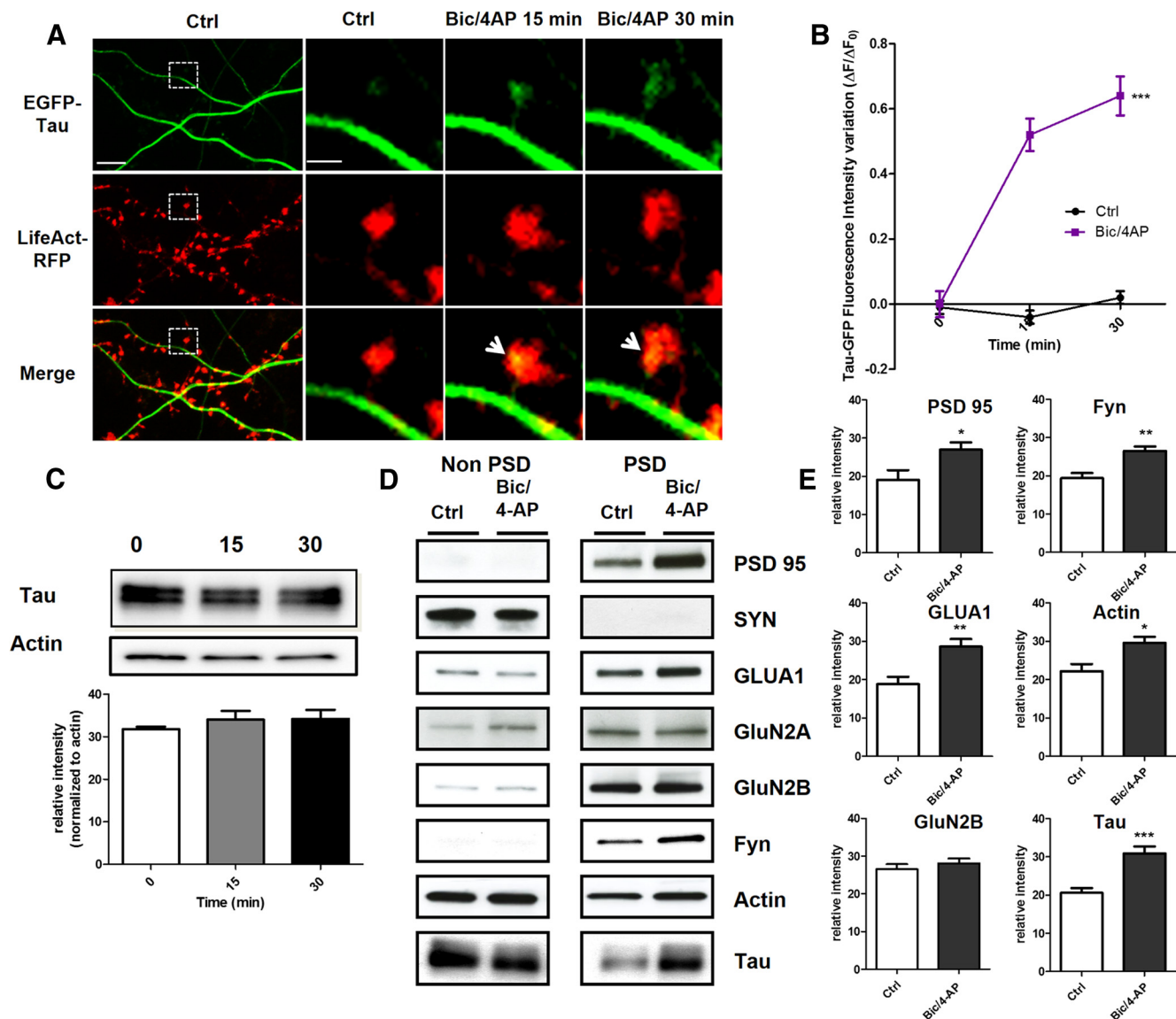


Figure 2. Synaptic activation induced by Bic/4-AP triggers translocation of tau into dendritic spines of primary cortical neuron cultures. **A**, Confocal imaging of cortical neurons (14 DIV) cotransfected with EGFP-Tau and LifeAct-RFP. Left, Spatial repartition of EGF-Tau (green) and LifeAct-RFP (red) in nonactivated neuron. The merged image displays only minor colocalization (yellow). Scale bar, 5 μ m. Right, Higher magnification of EGFP-Tau, LifeAct in dendritic spines (designated box in the left) of a neuron after synaptic activation triggered by 15 and 30 min of Bic/4-AP exposure. The merged image shows the activity driven colocalization of tau/LifeAct (yellow) in the activated dendritic spine after 15 and 30 min Bic/4-AP exposure. Scale bar, 1 μ m. **B**, Quantification of fluorescence intensity mediated by EGFP-Tau in the head of spines during synaptic activation (Bic/4-AP treatment). The graph represents the evolution of $\Delta F/F_0$ generated by EGFP-Tau in neurons subjected to synaptic activation or not. Statistical analysis was performed by two-way ANOVA followed by Bonferroni's posttest (mean $\pm$ SEM, *** p < 0.0001, control n = 40 spines on 3 independent cultures; Bic/4-AP n = 162 spines on 5 independent cultures). **C**, Representative Western blot of endogenous tau expression in a whole lysate extract of cortical neurons (14 DIV) exposed to Bic/4-AP for 15 and 30 min. Quantification of tau expression normalized to actin levels does not display any change. **D**, Representative Western blots of protein expression from primary cortical cultures after fractionation. Presynaptic protein (synaptophysin), postsynaptic proteins (PSD-95, GluA1, GluN2A, GluN2B, Fyn), cytoskeletal protein (actin), and tau in non-PSD fraction (Triton-soluble fraction) and PSD-fraction (Triton-insoluble fraction) on primary cortical neurons treated 15 min with Bic/4-AP. **E**, Quantitative analysis of PSD-95, GluA1, GluN2B, GluA1, Fyn, actin, and tau in the PSD fraction under control and Bic/4-AP (15 min) treated conditions is shown in graphs (mean $\pm$ SEM, 2-tailed Student's t test, *** p < 0.001, ** p = 0.0026, * p = 0.0101, N $\geq$ 7 independent cultures).

on synaptic EGFP-tau fluorescence localization. For this, we treated our primary cortical neurons with jasplakinolide (1 μ M), a compound that promotes actin polymerization (Lazaro-Dieuez et al., 2008), or with a latrunculin A (at 500 nM), a compound that depolymerizes F-actin into soluble globular actin (G-actin; Coué et al., 1987; Fig. 5C). After jasplakinolide application, we observed a large increase in synaptic EGFP-tau fluorescence (** p < 0.0001, 2-way ANOVA; $\Delta F/F_0$, 0.64 $\pm$ 0.05 after 15 min, 0.59 $\pm$ 0.06 after 30 min; control n = 40, N = 3; jasplakinolide, n = 106, N = 4; Fig. 4D). Latrunculin treatment produced rapid actin depolymerization and the corresponding disappearance of

LifeAct-RFP fluorescence in every spine studied; no synaptic EGFP-tau fluorescence was observed (data not shown).

We analyzed actin and tau in the PSD-enriched fraction from primary cortical neurons treated with jasplakinolide (Fig. 5E). We observed that increased neuronal F-actin content promotes concurrent tau enrichment (* p = 0.0150, 2-tailed Student's t test; control 17.49 $\pm$ 0.7755 vs jasplakinolide 27.02 $\pm$ 0.2719, N = 4 independent cultures; Fig. 5F). GLUA1, the membrane trafficking of which is known to be actin dependent, was increased (* p = 0.0279, 2-tailed Student's t test; control 16.91 $\pm$ 1.015 vs jasplakinolide 31.00 $\pm$ 4.778, N = 4 independent cultures). The

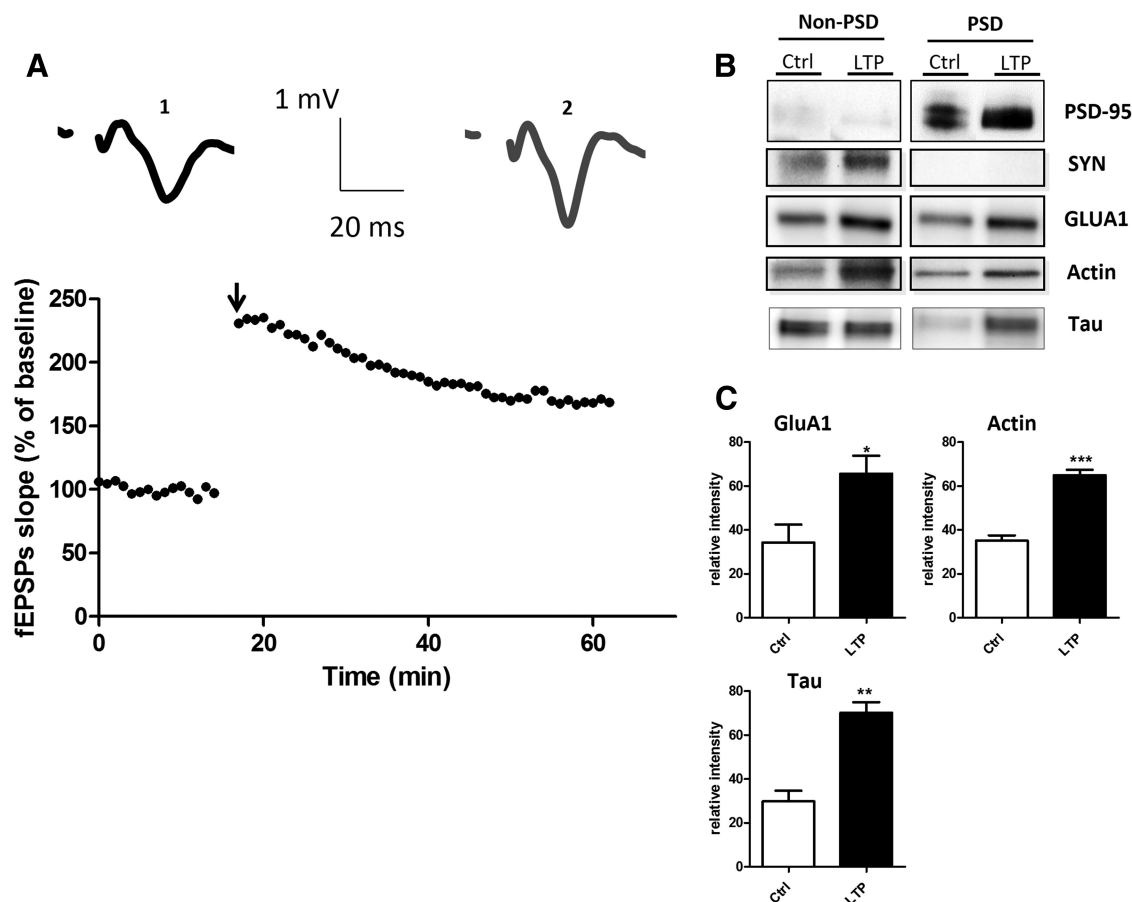


Figure 3. LTP in hippocampal slices triggers translocation of tau to CA1 dendritic spines. **A**, Representative curve of fEPSP slope in percentage of baseline illustrating the LTP induction in CA1 region of hippocampal slices. Sample EPSPs are shown before (1) and after (2) LTP induction. **B**, Representative Western blots of synaptic protein expression from the CA1 region of hippocampal slices subjected to LTP protocol. **C**, Quantifications of Western blot from GluA1, actin, and tau in control and LTP conditions (mean $\pm$ SEM, 2-tailed Student's *t* test, **p* = 0.0346, ***p* = 0.0011, ****p* = 0.0002, *N* = 4 independent slices).

amount of Fyn in the PSD was decreased (**p* = 0.0265, 2-tailed Student's *t* test; control 27.25 ± 5.003 vs jasplakinolide 11.71 ± 1.786 , *N* = 4 independent cultures). Together, these results suggest that tau translocation to the synapse depends on the F-actin stabilization that promotes their interaction.

Aβ oligomers disrupt the link between synaptic activation and tau recruitment to the synapse

In the context of AD, recent studies have shown that synaptotoxicity driven by Aβ exposure relies on the presence of tau (Rapport et al., 2002; Roberson et al., 2007; Ittner et al., 2010). To study this pathological regulation of tau, we exposed EGFP-tau and LifeAct-RFP-expressing cultures to 100 nM synthetic human Aβ's (1–42; Fig. 6A). We observed a delocalization of tau in the synapse within 15 min after Aβ treatment (***p* < 0.001; control *n* = 40, *N* = 3, Aβ 100 nM for 15 min 0.52 ± 0.04 , for 30 min 0.71 ± 0.05 , *n* = 79, *N* = 5 independent cultures; Fig. 6B). We confirmed these results with endogenous tau by Western blot analysis of PSD-enriched fractions (Fig. 6C). Aβ exposure induced a translocation of tau into the PSD fraction (***p* = 0.0002, 2-tailed Student's *t* test; control 20.12 ± 1228 vs Aβ 29.74 ± 1.748 , *N* = 12 independent culture). There was also an increase of PSD-95 (***p* = 0.0006, 2-tailed Student's *t* test; control 19.10 ± 2.557 vs Aβ 33.3 ± 2153 , *N* = 9 independent culture), GluA1 (***p* = 0.0078, 2-tailed Student's *t* test; control 18.84 ± 1.930 vs Aβ 26.22 ± 1.475 , *N* = 9 independent culture)

and fyn (***p* = 0.0041, 2-tailed Student's *t* test; control 19.42 ± 1.337 vs Aβ 29.67 ± 2.181 , *N* = 6 independent cultures; Fig. 6D). Then, we evaluated the effect of a synaptic activation after the Aβ treatment (Fig. 7A). Preceded by 15 min Aβ treatment, synaptic activation disrupted LifeAct-RFP fluorescence, suggesting an alteration of F-actin organization and no additional EGFP-tau recruitment at the synapse. We confirmed these results on endogenous proteins by Western blot analysis on PSD-positive fractions (Fig. 7B). After Aβ treatment, synaptic activation did not trigger any increase in synaptic markers and in fact decreased synaptic actin (***p* = 0.0009, 2-tailed Student's *t* test; Aβ 29.64 ± 1.495 , Aβ + Bic/4-AP 18.56 ± 2.030 , *N* = 7 independent cultures; Fig. 7C), PSD-95 (***p* = 0.0007, 2-tailed Student's *t* test; Aβ 33.37 ± 2.153 , Aβ + Bic/4-AP 19.25 ± 2.550 , *N* = 7 independent cultures) and tau levels (***p* = 0.0014, 2-tailed Student's *t* test; Aβ 29.74 ± 1.748 , Aβ + Bic/4-AP 20.68 ± 1.751 , *N* = 12 independent cultures). If the spines' protein content did not display any significant difference, these treatments are associated with a profound modification of the spine structure, as revealed by the morphological analysis performed on cortical culture transfected with a plasma membrane marker tagged with a GFP (Fig. 7D). Finally, we performed a phalloidin precipitation assay after a 15 min Aβ treatment on our neuron culture (Fig. 8A) and observed that tau/F-actin content was increased (**, **p* < 0.05 relative to control, #*p* < 0.05 relative to Aβ, 1-way ANOVA; control 15.45 ± 1.529 , Aβ 32.90 ± 3.181 , Aβ + Bic/

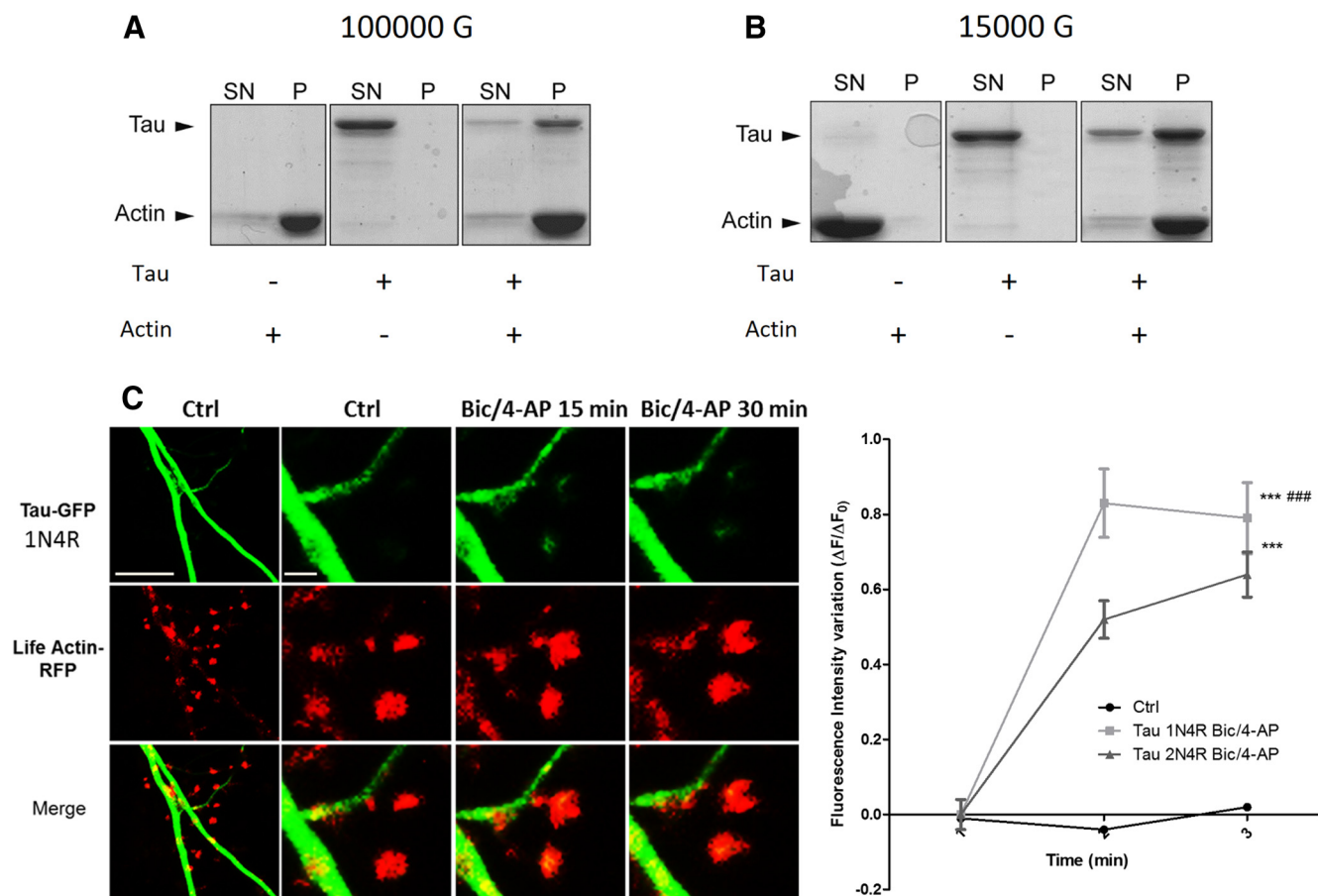


Figure 4. Tau interacts with actin in purified system. Cosedimentation of actin filaments with tau. Actin was polymerized at $5 \mu\text{M}$ for 1 h at room temperature in the absence or in the presence of $1 \mu\text{M}$ tau. The reaction mixtures were then centrifuged at $100,000 \times g$ to sediment actin filaments (**A**) or at $15,000 \times g$ to precipitate only actin bundles (**B**). Supernatants (SN) and pellets (P) were applied to 10% SDS-PAGE gel and proteins were stained with Coomassie blue. **C**, Confocal imaging of cortical neurons (14 DIV) cotransfected with EGFP-Tau1N4R and LifeAct-RFP. Left, Spatial repartition of EGFP-Tau1N4R (green) and LifeAct-RFP (red) in untreated neurons. Scale bar, $5 \mu\text{m}$. Right, Higher magnification of EGFP-Tau1N4R and LifeAct-RFP in a dendritic spine neuron after Bic/4-AP treatment (15 and 30 min, designated box in the left) by 15 and 30 min of Bic/4-AP treatment. The merged image shows colocalization of F-actin and tau. Scale bar, $1 \mu\text{m}$. **D**, Quantification of fluorescence intensity mediated by EGFP-Tau1N4R and Tau2N4R in the head of spines during synaptic activation (Bic/4-AP treatment). The graph represents the evolution of $\Delta F/F_0$ generated by EGFP-Tau2N4R and EGFP-Tau1N4R in neurons subjected to synaptic activation or not. Statistical analysis was performed by two-way ANOVA followed by Bonferroni's posttest (mean $\pm$ SEM, *** $p < 0.0001$ vs control, ### $p < 0.0001$ vs Tau-2N4R; control $n = 40$ spines on 3 independent cultures; Bic/4-AP Tau2N4R $n = 162$ spines on 5 independent cultures, Bic/4-AP Tau 1N4R $n = 54$ spines on 2 independent cultures).

4-AP 20.18 ± 2671 for actin; control 16.34 ± 2.618 , A β 31.77 ± 1.952 , A β + Bic/4-AP 17.70 ± 4.080 for tau, $N = 5$ independent cultures (Fig. 8B). A subsequent synaptic activation did alter tau interaction with F-actin.

Pool of synaptic tau evoked by A β is more dynamic and has a distinct phosphorylation state from that induced by synaptic activation

Because image acquisition for live imaging of EGFP-tau was performed at a relatively slow rate to accumulate fluorescence intensity, we did not have any direct measurement of tau turnover in the spines. To further understand the mechanisms by which A β exposure and the synaptic activation induced translocation of tau to the synapse, we investigated tau dynamics using a FRAP technique. On neurons transfected with EGFP-tau and LifeAct-RFP, we induced tau translocation to spine by synaptic activation, and then photobleached the GFP signal of individual spine heads (Fig. 9A) and measured tau fluorescence, which resulted in a recovery half-life of 4.829 s and a plateau of 50.83% (Fig. 9B). The recovery curves indicated 3 pools of tau: a mobile, unbleached fraction comprising $9.72 \pm 1.03\%$, a dynamic fraction at $47.08 \pm 3.06\%$, and a stable, unrecover-

able fraction at $42.75 \pm 2.78\%$. This stable fraction suggests that a large portion of tau is anchored in the spine. When we investigated A β -driven tau translocation to the synapse, we did not see any change in half-life recovery (4.729 s) from those measured with synaptic activation. However, the plateau value was drastically modified (71.20%), illustrating that, whereas A β induced tau translocation and subsequently its interaction with actin filament, the resulting synaptic tau is less stable. Comparison between synaptic activation and A β showed a significant difference between their dynamic fractions (*** $p < 0.0001$, 2-tailed Student- t test; Bic/4AP dynamic fraction 47.09 ± 3.063 , $n = 21$ spines on 4 independent cultures; A β 68.49 ± 2.64 , $n = 24$ on 4 independent cultures; Fig. 9C).

Tau is a phosphorylated protein containing 80 potential phosphorylation sites (Sergeant et al., 2005). Alterations of tau localization in disease states are associated with abnormal phosphorylation of tau (Hoover et al., 2010; Tai et al., 2012; Merino-Serrais et al., 2013); therefore, we investigated the phosphorylation state of tau after synaptic activation or A β exposure (Fig. 9D). We chose to investigate the phosphorylation states of two representative residues that have both been described as sites of physiological and pathological phosphor-

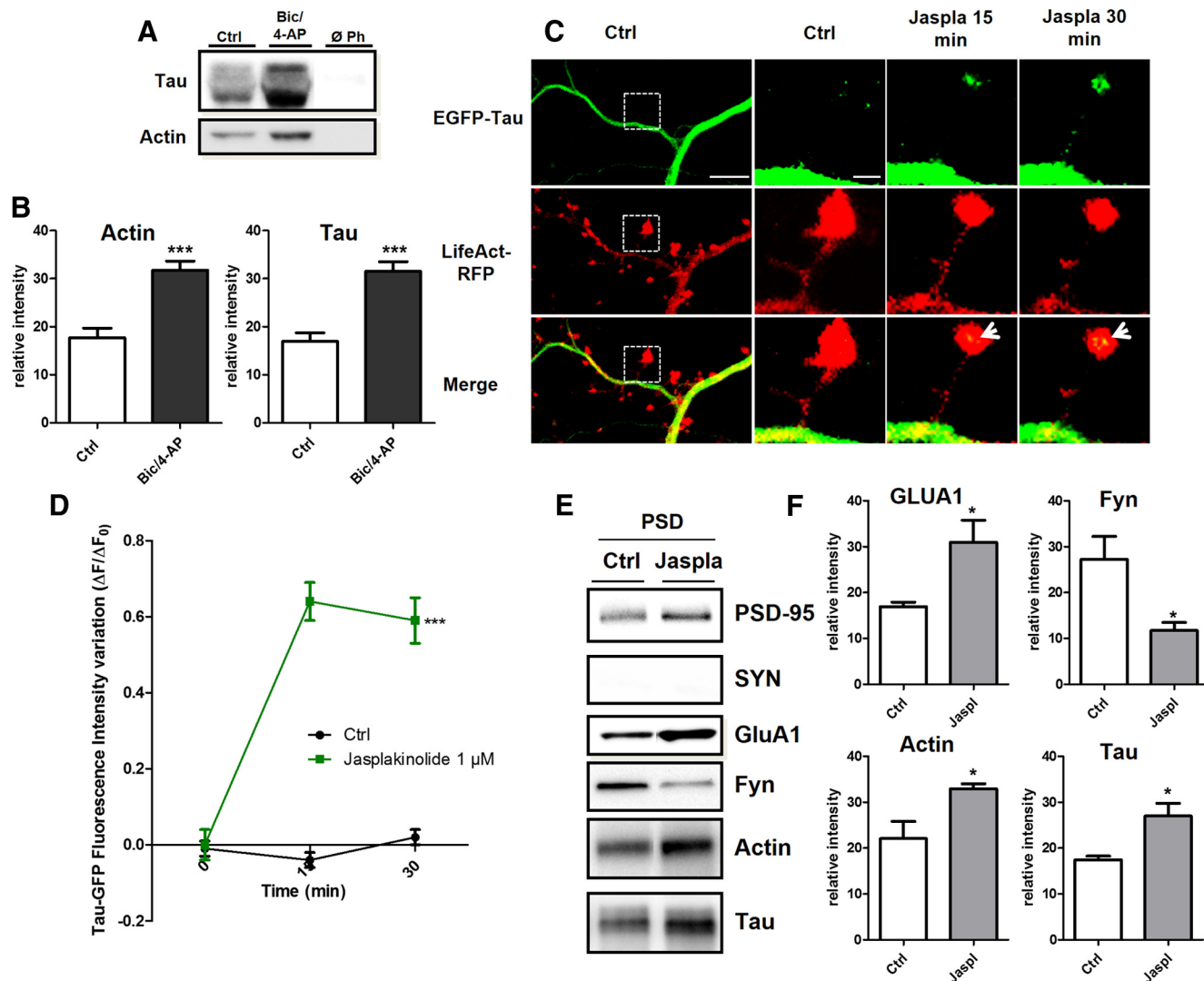


Figure 5. Tau interacts with F-actin in the synaptic compartment. **A**, Representative Western blot showing F-actin-associated tau in cultured cortical neurons treated for 15 min with Bic/4-AP. Cell lysate was collected after treatment and F-actin precipitated with phalloidin as described in the Materials and Methods. **B**, Quantifications of actin and tau in control and Bic/4-AP condition (mean $\pm$ SEM, 2-tailed Student's *t* test, ****p* < 0.001, *N* = 7 independent cultures). **C**, Confocal imaging of cortical neurons (14 DIV) cotransfected with EGFP-Tau and LifeAct-RFP treated with jasplakinolide (1 μ M), a specific agent that stabilizes F-actin. Left, Cropped view of dendritic branch of transfected neuron under control condition. Scale bar, 5 μ m. Right, Higher magnification of EGFP-Tau and LifeAct-RFP in dendritic spines (cropped view of dotted box in the left) of neuron before and 15 and 30 min after jasplakinolide (1 μ M) treatment. The merged image shows colocalization of EGFP-Tau and LifeAct-RFP (white arrows). Scale bar, 1 μ m. **D**, Quantification of the fluorescence intensity variation ($\Delta F/F_0$) of EGFP-Tau in the head of spines during actin network stabilization (jasplakinolide treatment). Statistical analysis was performed by two-way ANOVA followed by Bonferroni's posttest (mean $\pm$ SEM, ****p* < 0.0001, control *n* = 40, *N* = 3 independent cultures, jasplakinolide *n* = 106, *N* = 4 independent cultures). **E**, Representative Western blots of protein expression from PSD-enriched fraction primary cortical cultures treated or not with jasplakinolide (1 μ M, synaptophysin [SYN], PSD-95, GluA1, Fyn actin, and tau in PSD-fraction (Triton-insoluble fraction)). **F**, Quantitative analysis of Western blots of PSD-95, GluA1, actin, and tau in PSD fraction (mean $\pm$ SEM, 2-tailed Student's *t* test, ***p* < 0.01, **p* < 0.05, *N* = 4 independent cultures).

ylation: one located in the proline rich domain, Thr-205, and one located in the C terminus domain, Ser-404 (Sergeant et al., 2005; Merino-Serrais et al., 2013). Thr-205 phosphorylated-tau was only increased under synaptic activation in the PSD fraction (control 24.57 ± 0.9754 vs Bic/4-AP 38.90 ± 1.936 ; Fig. 9E), whereas it was decreased after A β treatment (control 24.57 ± 0.9754 vs A β 13.64 ± 2.416). Synaptic activation after A β exposure did not produce any significant Thr-205 phosphorylation of tau (A β + Bic/4-AP 22.89 ± 2.796 vs Bic/4-AP 38.90 ± 1.93 vs A β 13.64 ± 2.50). Conversely, only A β exposure promoted significant tau phosphorylation on Ser 404 (***p* < 0.05, 1-way ANOVA; control 15.67 ± 2.418 vs A β 32.65 ± 3.76 vs Bic/4-AP 26.75 ± 1.17 vs A β + Bic/4-AP 24.97 ± 4.48 , *N* = 4). These results revealed that, although synaptic activation or A β promote tau translocation to PSD

fractions, the synaptic tau displays a different phosphorylation profile that may be responsible for the conditional tau properties observed. Finally, to investigate whether the difference in tau retention in the spine was related to differential phosphorylation, we overexpressed nonphosphorylatable tau mutant EGFP-Tau T205A or EGFP-Tau S404A in neurons exposed to synaptic activation or to A β exposure. We observed that synaptic activation promoted EGFP-Tau T205A translocation to the spine but FRAP experiments revealed a shorter tau turnover time in the spine (Fig. 9B), whereas A β -driven translocation to the spine was no longer observable in EGFP-Tau S404A-transfected neurons (Fig. 9F, G). These experiments highlight the pivotal role of these phosphorylations in tau translocation features to the spine.

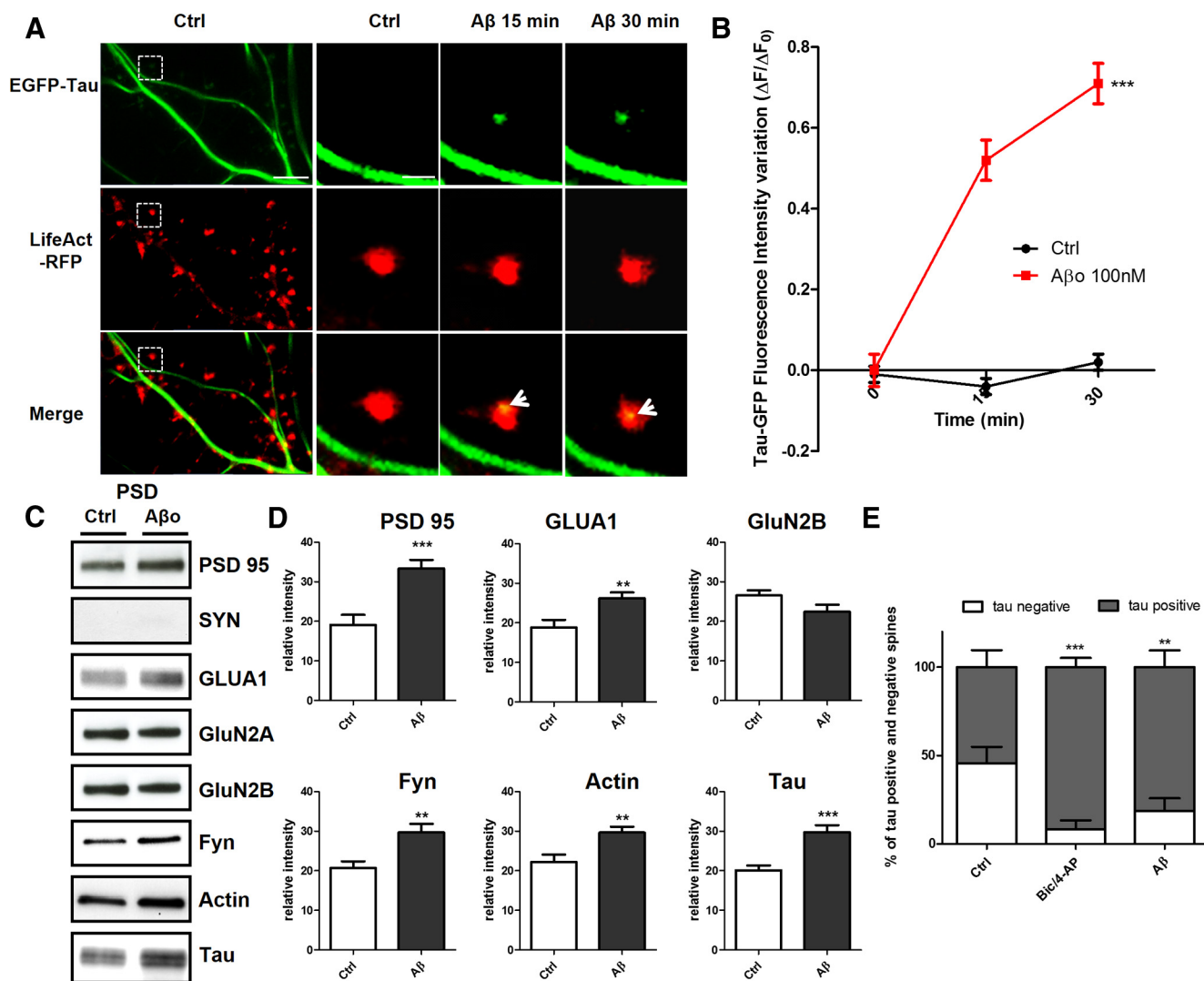


Figure 6. Aβo treatment in primary cortical neuron cultures induces synaptic mislocalization of EGFP-Tau. **A**, Confocal imaging of cortical neurons (14 DIV) cotransfected with EGFP-Tau (full-length human tau) and LifeAct-RFP. Left, Spatial repartition of EGFP-Tau (green) and LifeAct-RFP (red) in nontreated neuron. Scale bar, 5 μm. Right, Higher magnification of EGFP-Tau and LifeAct-RFP in dendritic spine neuron after Aβo treatment (15 and 30 min, designated box in the left) by 15 and 30 min of Aβo 100 nM treatment. The merged image shows colocalization of F-actin and tau (yellow, area indicated with white arrows). Scale bar, 1 μm. **B**, Quantification of the fluorescence intensity of EGFP-Tau in the head of spines during the Aβo treatment. The graph represents the evolution of ΔF/F₀ generated by EGFP-Tau induced by Aβo 100 nM treatment. Statistical analysis was performed by two-way ANOVA followed by Bonferroni's posttest (mean ± SEM, ****p* < 0.001, control *n* = 40, *N* = 3 independent cultures; Aβo 100 nM *n* = 79, *N* = 5 independent cultures). **C**, Representative Western blots of protein expression from fractionated primary cortical cultures treated or not with Aβo (100 nM) for 30 min. Presynaptic protein (synaptophysin), postsynaptic proteins (PSD-95, GluA1, GluN2A, GluN2B, Fyn), cytoskeletal protein (actin), and tau in PSD-fraction (Triton-insoluble fraction) were analyzed. **D**, Quantitative analysis of PSD-95, GluA1, GluN2B, GluA1, Fyn, actin, and tau in PSD fractions (mean ± SEM, 2-tailed Student's *t* test, ****p* < 0.001, ***p* < 0.01, *n* ≥ 7 independent cultures). **E**, Percentage of positives and negatives spines in EGFP-Tau-transfected neurons before and during synaptic activation or Aβo treatment (Bic/4-AP *N* = 3, *n* = 130 spines; Aβo *N* = 3, *n* = 142; control *N* = 6, *n* = 272; ****p* < 0.0001, ***p* > 0.01).

Discussion

Although tau has been extensively studied for its role as an axonal MAP, the discovery of its synaptic localization under pathological conditions has raised extensive questions on the consequence of this mislocation (Ittner and Götz, 2011). Here, we report that tau displays a widespread distribution in the dendrites and responds to synaptic input by trafficking from the dendritic shaft to the postsynaptic compartments. The trafficking of tau occurs under pharmacological and electrophysiological synaptic plasticity stimulation paradigms in primary culture and acute hippocampal slices, respectively. This activity-dependent tau translocation is concomitant with major recompositions of the postsynaptic protein content that results in an increase in PSD-95, glutamatergic AMPA receptors, GluA1, actin, and tau's proposed partner, Fyn kinase. Together, our results are consistent with tau having a

postsynaptic role in the organization that sustains synaptic plasticity. Further, we demonstrate that, once translocated to the synapse, tau interacts with the most predominant cytoskeleton element of the postsynaptic structure: F-actin. This interaction is consistent with a possible implication in the complex cascade leading to synaptic potentiation. Further supporting this hypothesis, we observed that pharmacological stabilization of F-actin with jasplakinolide also induces synaptic tau trafficking, which suggests a link between F-actin and tau. Interestingly, we found that by exposing cortical neurons to synthetic Aβo, tau translocates to spines without induced synaptic activation. This mislocation of tau into the spine heads is a characteristic feature observed in AD (Tai et al., 2012) and frontotemporal dementia (FTD) and parkinsonism linked to chromosome 17 (FTDP-17) and tau P301L mutation (Hoover et al., 2010). Synaptic activa-

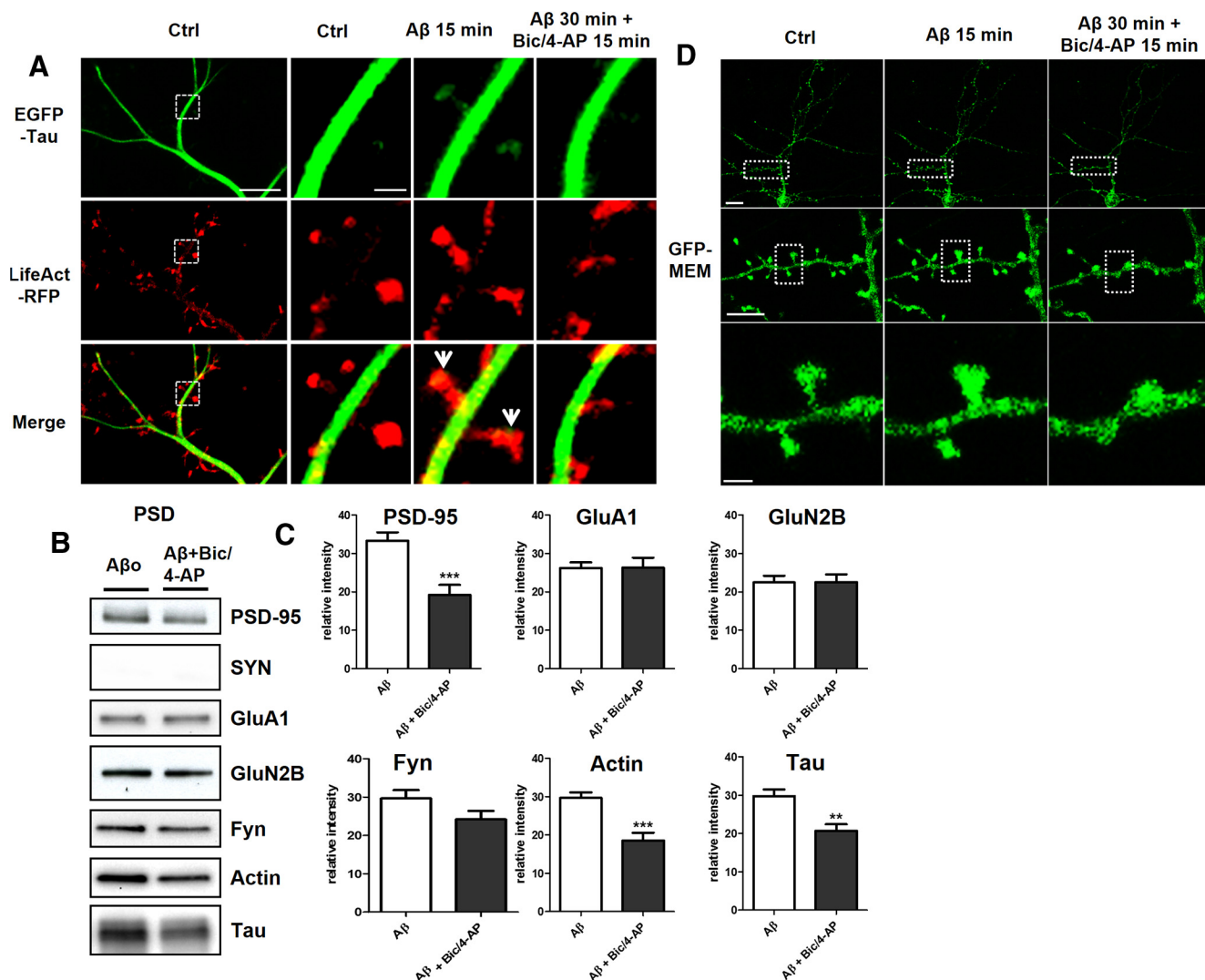


Figure 7. A β treatment on primary cortical neuron cultures induces synaptic mislocalization of endogenous tau that is disrupted by synaptic activation. **A**, Confocal imaging of cortical neurons (14 DIV) cotransfected with EGFP-Tau and LifeAct-RFP. Left, Spatial repartition of EGFP-Tau (in green) and LifeAct-RFP (in red) in untreated neurons. Scale bar, 5 μ m. Right, Higher magnification of EGFP-Tau and LifeAct-RFP in a dendritic spine (designated box in the left) neuron showing the effect of 15 min of A β on tau localization (green) and actin cytoskeleton (red) followed by 15 min of Bic/4-AP. Scale bar, 1 μ m. **B**, Representative Western blots of protein expression from fractionated primary cortical neurons treated with A β (100 nM) and then for 15 min with Bic/4-AP. Presynaptic protein (synaptophysin), postsynaptic proteins (PSD-95, GluA1, GluN2A, GluN2B, Fyn), cytoskeleton protein (actin), and tau in PSD-fraction (Triton-insoluble fraction) were analyzed. **C**, Quantitative analysis of PSD-95, GluA1, GluN2B, GluA1, Fyn, actin, and tau in PSD fraction (mean $\pm$ SEM, 2-tailed Student's *t* test, $N \geq 7$). **D**, Confocal imaging of cortical neurons (14 DIV) transfected with GFP membrane. Top, Untreated neurons. Scale bar, 10 μ m. Middle and Right, higher magnification of GFP membrane in dendrites (scale bar, 5 μ m) and dendritic spine (designated box in the middle) from a neuron showing the effect of 15 min of A β treatment on spines followed by 15 min of Bic/4-AP. Scale bar, 1 μ m.

tion subsequent to A β did not further increase tau content into the dendritic spines, which suggests that A β exposure disrupts the activity-dependent enrichment of tau concomitant with the preclusion of synaptic plasticity.

The identification of activity-driven translocation of tau to the synaptic compartment is consistent with Ittner et al. (2010), who described tau function as carrying the Src kinase Fyn to the synaptic compartment after synaptic activation. The present findings also add to the growing body of evidence consistent with a wide distribution of neuronal tau in the dendrites (Tashiro et al., 1997) and the axon (Mandell and Banker, 1996). Tau is a well known MAP and microtubules have been shown to penetrate into spines (Jaworski et al., 2009; Merriam et al., 2013), which strongly suggests that microtubules are involved in the observed translocation. Different mechanisms may account for the distribution of tau in dendritic spine, for example, cotransport with microtubule fragments or by motor transport or diffusion. The

simplest, and therefore most likely, scenario is one in which tau enters spines with microtubules. After being liberated from MTs, tau may bind to actin filaments, thereby anchoring tau within the postsynaptic compartment. This hypothesis is supported by previous work from Ittner et al. (2010), which showed that removing the MT-associated domain from tau prevents the synaptic localization of tau and its binding partner Fyn. When tau is truncated to contain only the N-terminal and proline-rich domains, tau is unable to localize to dendrites. Because this truncated form of tau is still able to bind Fyn, the exclusion of tau from spines also precludes fyn localization to the postsynaptic compartment. As an active transporter of synaptic proteins (e.g., AMPARs; Kneusel and Wagner, 2013), myosin may also carry tau to the spines along a cytoskeletal track. Currently, only one study suggests an interaction between tau and myosin based on their colocalization within neurofibrillary tangles found in AD and FTD patients' brains (Feuillet et al., 2010). Moreover, myosin VI was shown to

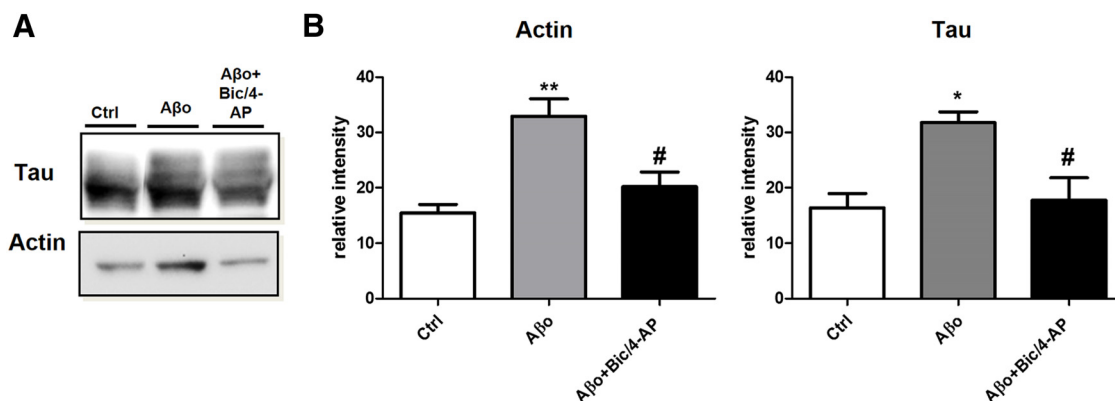


Figure 8. Aβ treatment on primary cortical neuron cultures increases the interaction of F-actin with tau, which is reduced after synaptic activation. **A**, Representative Western blot showing the effect of 30 min Aβ (100 nM) and the effect of 15 min pretreatment with Aβ (100 nM) then 15 min of Bic/4-AP treatment on tau associated with F-actin in cultured cortical neurons. F-actin was collected after treatment and precipitated with phalloidin. **B**, Western blot analysis of actin and tau in control, Aβ (100 nM), and Aβ (100 nM) + Bic/4-AP 15 min condition (**, * $p < 0.05$ vs control, 1-way ANOVA; # $p < 0.05$ vs Aβ, $N = 5$ independent cultures).

modulate tau-dependent neurodegeneration in the Thy-Tau22 *Drosophila* model (Blard et al., 2007). However, these studies provide no direct evidence for a physiological interaction between tau and myosin. Last, tau is unlikely to enter spines through simple diffusion because very little tau is present in spines before synaptic activation or exposure to Aβ. Therefore, we favor a combined mechanism that involves tau diffusion along the microtubule lattice, as demonstrated by Hinrichs et al. (2012). When microtubules are briefly entering the dendritic spines during activation, tau diffusion guided by the microtubule lattice may promote spine distribution independently of directed motor-dependent transport. The importance of tau translocation to spines warrants further investigation of the many potential mechanisms, which may be different depending on the evoking stimuli.

Once located in the spines, tau may contribute to spine morphology. Such a role is supported by previous observations that the silencing of tau expression using small hairpin RNA produced spine loss in cultured neurons (Chen et al., 2012).

The stimuli that led to tau translocation into spine heads also induced the long-lasting modifications of the postsynaptic element that characterize LTP. The tau increase in the PSD-enriched fraction is concomitant with enrichment in PSD95 and GluA1, both of which are necessary characteristics of synaptic potentiation (Ehlers, 2003; Steiner et al., 2008; Kessels and Malinow, 2009). Following the same behavior of well known plasticity-related synaptic proteins such as GluA1, PSD-95, or actin suggests that tau may contribute to the functional modifications that sustain the enhanced synaptic strength associated with LTP. The role of tau in synaptic plasticity could be due to its ability to transport the Src kinase Fyn to synaptic targets (e.g., GluN2B subunits of the NMDA receptor). In accordance with this hypothesis, tau KO mice or those expressing tau without MT-binding domains display no Fyn in the PSD fraction (Ittner et al., 2010). The importance of Fyn in synaptic plasticity processes is underscored by the decreased LTP observed in Fyn KO mice (Grant et al., 1992; Kojima et al., 1997).

Tau interacts with F-actin in both purified protein assay and spines. This interaction was identified and characterized for the first time in similar purified protein assay involving tau MT-binding domains and the portion of the proline-rich domain that interacts directly with F-actin (He et al., 2009). Similarly, this interaction has been identified in PC12 cells (Yu and Rasenick,

2006) and in a *Drosophila* model of AD (Fulga et al., 2006). The consequences of the interaction between tau and F-actin are a stabilization of actin filaments and their organization into bundles. Here, we show that interaction between F-actin and tau is increased during synaptic activation. As revealed by LifeAct fluorescence, filamentous actin displays a higher concentration in the spine heads. The potential interaction of tau and filamentous actin in the shaft and then the translocation to the synapse is possible, although we favor a molecular mechanism that involves interaction of tau/actin in the spine because of the presence of this dense spine actin cytoskeleton. The role of actin in the structural reorganization necessary for synaptic plasticity has been studied extensively (for review, see Hotulainen and Hoogenraad, 2010). Indeed, modulation of actin dynamics toward F-actin complex structures can be considered as one of the key elements responsible for the activity-dependent modification of spine morphology during synaptic plasticity (Star et al., 2002). Therefore, tau may be important for synaptic plasticity because of its ability to influence F-actin structure or stability. F-actin as causal to tau translocation is central to our hypothesis. The fact that jasplakinolide treatment induces a translocation of tau to spine heads strongly supports a causal relation between these events (i.e., direct stabilization of F-actin produces tau translocation).

Finally, when we reproduced pathological conditions observed in AD by exposing cortical neurons to Aβ, we observed a translocation of tau to the synapse despite the lack of synaptic activation. This result is consistent with abnormal tau accumulation in dendritic spines (Hoover et al., 2010). Recently, similar synaptic accumulation of tau has been described in AD patients, further strengthening the hypothesis that abnormal synaptic localization of tau may be involved in the synaptic dysfunction observed in AD (Roberson et al., 2011; Tai et al., 2012). Under Aβ exposure, tau still interacts with F-actin once in the postsynaptic compartment. Our FRAP data highlighted a more dynamic pool of synaptic tau under Aβ compared with that evoked by synaptic activation, which suggests that tau interactions with its potential partners in the synapse, such as F-actin, are disturbed. This likely disrupts tau-related modification of the postsynaptic content observed during synaptic plasticity. Therefore, synaptic activation in the presence of Aβ did not lead to increased levels PSD95 or GluA1 in the PSD fraction and precluded the establishment of long-lasting modification of synaptic strength, which is

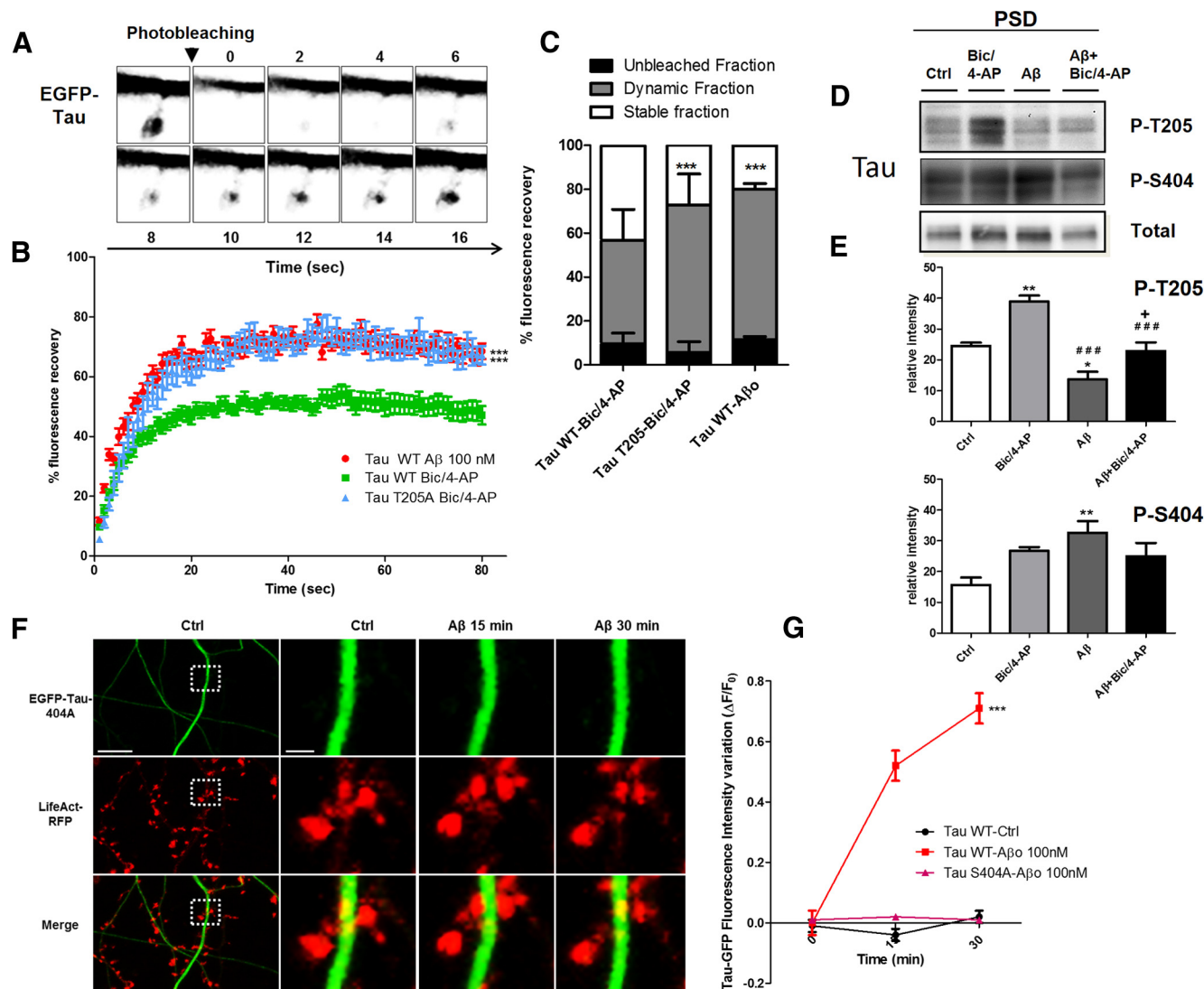


Figure 9. The dynamics of tau in spines changes is distinct between translocation inducing synaptic activation from $A\beta$ exposure and could be phosphorylation dependent. **A**, Time lapse of a spine pretreated with Bic/4-AP containing EGFP-tau and showing FRAP. **B**, Representative FRAP curves (%FRAP normalized to the prebleached intensity of the spine of EGFP-Tau-transfected neurons) of Tau WT (EGFP-Tau 2N4R) after 45 min of Bic/4AP (green, $n = 21$) or 45 min after $A\beta$ application (red, $n = 24$) and TauT205A after 45 min of Bic/4AP (blue, $n = 21$). **C**, Percentage of EGFP-tau fluorescence or EGFP-tauT205A that was stable (white), dynamic (gray), or unbleached (black). Statistical analysis was performed by 2-tailed t test, $***p < 0.0001$. **D**, Representative Western blot of Tau phospho-Threonine 205 (p-Thr205), phospho-Serine 404 (p-Ser 404), and tau total from PSD-enriched fractions for control, Bic/4-AP (30 min), $A\beta$ (30 min), and $A\beta$ (15 min) + Bic/4-AP (15 min) conditions. **E**, Quantifications of p-Thr205 and p-Ser404 under control, Bic/4-AP, $A\beta$, or $A\beta$ + Bic/4-AP conditions (mean $\pm$ SEM, **, relative to control; ### relative to Bic/4-AP, + relative to $A\beta$, $p > 0.05$, 1-way ANOVA with Bonferroni's posttest, $N = 5$ independent cultures). **F**, Confocal imaging of cortical neurons (14 DIV) cotransfected with EGFP-Tau S404A and LifeAct-RFP. Left, Spatial repartition of EGFP-TauS404A (green) and LifeAct-RFP (red) in untreated neurons. Scale bar, $5 \mu\text{m}$. Right, Higher magnification of EGFP-Tau S404A and LifeAct-RFP in dendritic spine neuron after $A\beta$ treatment (15 and 30 min, designated box in the left) by 15 and 30 min of $A\beta$ 100 nM treatment. The merged image shows no colocalization of F-actin and tau. Scale bar, $1 \mu\text{m}$. **G**, Quantification of the fluorescence intensity of EGFP-TauS404A in the head of spines during the $A\beta$ treatment. The graph represents the evolution of $\Delta F/F_0$ generated by EGFP-Tau under control conditions (black), EGFP-Tau (red), and EGFP-TauS404A (pink) induced by $A\beta$ 100 nM treatment. Statistical analysis was performed by 2-way ANOVA followed by Bonferroni's posttest (mean $\pm$ SEM, $***p < 0.001$, control $n = 40$, $N = 3$ independent cultures; Tau-WT $A\beta$ 100 nM $n = 79$, $N = 5$; Tau S404A $n = 98$, $N = 3$ independent cultures).

consistent with the exhaustive reports of $A\beta$ impairing LTP (Shankar et al., 2007; Selkoe, 2008; Li et al., 2011).

The difference in tau behavior depending on the stimulus driving it to the synapse is puzzling and may rely on the variation in the phosphorylation profile (Allyson et al., 2010; Mondragón-Rodríguez et al., 2012). It is now well accepted that tau function and localization to the membrane, nucleus, synapse, or axons is modulated by phosphorylation (Mandell and Banker, 1996; Sultan et al., 2011; Pooler et al., 2012; Hoover et al., 2010). We showed that $A\beta$ and synaptic activation display differences in the phosphorylation of two tau phospho-epitopes. Under synap-

tic activation, PSD-located tau is phosphorylated on threonine 205, whereas it is largely dephosphorylated under $A\beta$ exposure. In contrast, serine 404 is not differentially phosphorylated between these two experimental conditions. The nonphosphorylation incompetent mutated tau exhibited drastic different features, with wild-type tau strengthening the importance of these phosphorylations in tau behavior.

In summary, we provide evidence that, under physiological stimulations, tau may be involved in the molecular cascade leading to synaptic plasticity. $A\beta$ renders the synapse unable to establish plasticity-related modifications of the postsynaptic

content. The disruption of the activity-driven relocalization of tau to the synapse by A β could be one of the synaptotoxic steps in the progression of AD. The mechanism responsible for the altered localization of tau may represent a novel therapeutic approach for tauopathies, including AD.

References

- Allyson J, Dontigny E, Auberson Y, Cyr M, Massicotte G (2010) Blockade of NR2A-containing NMDA receptors induces tau phosphorylation in rat hippocampal slices. *Neural Plast* 2010:340168. [CrossRef Medline](#)
- Blard O, Feuillet S, Bou J, Chaumette B, Frébourg T, Campion D, Lecourtis M (2007) Cytoskeleton proteins are modulators of mutant tau-induced neurodegeneration in *Drosophila*. *Hum Mol Genet* 16:555–566. [CrossRef Medline](#)
- Chen Q, Zhou Z, Zhang L, Wang Y, Zhang YW, Zhong M, Xu SC, Chen CH, Li L, Yu ZP (2012) Tau protein is involved in morphological plasticity in hippocampal neurons in response to BDNF. *Neurochem Int* 60:233–242. [CrossRef Medline](#)
- Coué M, Brenner SL, Spector I, Korn ED (1987) Inhibition of actin polymerization by latrunculin A. *FEBS Lett* 213:316–318. [CrossRef Medline](#)
- Ehlers MD (2003) Activity level controls postsynaptic composition and signaling via the ubiquitin-proteasome system. *Nat Neurosci* 6:231–242. [CrossRef Medline](#)
- Feuillet S, Deramecourt V, Laquerriere A, Duyckaerts C, Delisle MB, Maurage CA, Blum D, Buée L, Frébourg T, Campion D, Lecourtis M (2010) Filamin-A and Myosin VI colocalize with fibrillary Tau protein in Alzheimer's disease and FTDP-17 brains. *Brain Res* 1345:182–189. [CrossRef Medline](#)
- Fulga TA, Elson-Schwab I, Khurana V, Steinhilb ML, Spire TL, Hyman BT, Feany MB (2006) Abnormal bundling and accumulation of F-actin mediates tau-induced neuronal degeneration in vivo. *Nat Cell Biol* 9:139–148. [CrossRef Medline](#)
- Götz J, Xia D, Leinenga G, Chew YL, Nicholas H (2013) What renders TAU toxic. *Front Neurol* 4:72. [CrossRef Medline](#)
- Grant SG, O'Dell TJ, Karl KA, Stein PL, Soriano P, Kandel ER (1992) Impaired long-term potentiation, spatial learning, and hippocampal development in fyn mutant mice. *Science* 258:1903–1910. [CrossRef Medline](#)
- He HJ, Wang XS, Pan R, Wang DL, Liu MN, He RQ (2009) The proline-rich domain of tau plays a role in interactions with actin. *BMC Cell Biol* 10:81–92. [CrossRef Medline](#)
- Hinrichs MH, Jalal A, Brenner B, Mandelkow E, Kumar S, Scholz T (2012) Tau protein diffuses along the microtubule lattice. *J Biol Chem* 287:38559–38568. [CrossRef Medline](#)
- Hoover BR, Reed MN, Su J, Penrod RD, Kotilinek LA, Grant MK, Pitstick R, Carlson GA, Lanier LM, Yuan LL, Ashe KH, Liao D (2010) Tau mislocalization to dendritic spines mediates synaptic dysfunction independently of neurodegeneration. *Neuron* 68:1067–1081. [CrossRef Medline](#)
- Hotulainen P, Hoogenraad CC (2010) Actin in dendritic spines: connecting dynamics to function. *J Cell Biol* 189:619–629. [CrossRef Medline](#)
- Ittner LM, Götz J (2011) Amyloid- β and tau—a toxic pas de deux in Alzheimer's disease. *Nat Rev Neurosci* 12:65–72. [CrossRef Medline](#)
- Ittner LM, Ke YD, Delerue F, Bi M, Gladbach A, van Eersel J, Wölfling H, Chiang BC, Christie MJ, Napier IA, Eckert A, Staufenbiel M, Hardeman E, Götz J (2010) Dendritic function of tau mediates amyloid- β toxicity in Alzheimer's disease mouse models. *Cell* 142:387–397. [CrossRef Medline](#)
- Jaworski J, Kapitein LC, Gouveia SM, Dortland BR, Wulf PS, Grigoriev I, Camera P, Spangler SA, Di Stefano P, Demmers J, Krugers H, Defilippi P, Akhmanova A, Hoogenraad CC (2009) Dynamic microtubules regulate dendritic spine morphology and synaptic plasticity. *Neuron* 61:85–100. [CrossRef Medline](#)
- Jaworski T, Kügler S, Leuven F (2010) Modeling of tau-mediated synaptic and neuronal degeneration in Alzheimer's disease. *Int J Alzheimers Dis* 2010:pii:573138. [CrossRef Medline](#)
- Kessels HW, Malinow R (2009) Synaptic AMPA receptor plasticity and behavior. *Neuron* 61:340–350. [CrossRef Medline](#)
- Kneussel M, Wagner W (2013) Myosin motors at neuronal synapses: drivers of membrane transport and actin dynamics. *Nat Rev Neurosci* 14:233–247. [CrossRef Medline](#)
- Kojima N, Wang J, Mansuy IM, Grant SG, Mayford M, Kandel ER (1997) Rescuing impairment of long-term potentiation in fyn-deficient mice by introducing Fyn transgene. *Proc Natl Acad Sci U S A* 94:4761–4765. [CrossRef Medline](#)
- Lázaro-Díéguez F, Aguado C, Mato E, Sánchez-Ruiz Y, Esteban I, Alberch J, Knecht E, Egea G (2008) Dynamics of an F-actin aggregate generated by the actin-stabilizing toxin jasplakinolide. *J Cell Sci* 121:1415–1425. [CrossRef Medline](#)
- Lee G, Newman ST, Gard DL, Band H, Panchamoorthy G (1998) Tau interacts with src-family non-receptor tyrosine kinases. *J Cell Sci* 111:3167–3177. [CrossRef Medline](#)
- Léveillé F, El Gaamouch F, Goux E, Lecocq M, Lobner D, Nicole O, Buisson A (2008) Neuronal viability is controlled by a functional relation between synaptic and extrasynaptic NMDA receptors. *FASEB J* 22:4258–4271. [CrossRef Medline](#)
- Li S, Jin M, Koeglperger T, Shepardson NE, Shankar GM, Selkoe DJ (2011) Soluble A β oligomers inhibit long-term potentiation through a mechanism involving excessive activation of extrasynaptic NR2B-containing NMDA receptors. *J Neurosci* 31:6627–6638. [CrossRef Medline](#)
- Loomis PA, Howard TH, Castleberry RP, Binder LI (1990) Identification of nuclear tau isoforms in human neuroblastoma cells. *Proc Natl Acad Sci U S A* 87:8422–8426. [CrossRef Medline](#)
- Malinow R, Malenka RC (2002) AMPA receptor trafficking and synaptic plasticity. *Annu Rev Neurosci* 25:103–126. [CrossRef Medline](#)
- Mandell JW, Banker GA (1996) A spatial gradient of tau protein phosphorylation in nascent axons. *J Neurosci* 16:5727–5740. [CrossRef Medline](#)
- Merino-Serrais P, Benavides-Piccione R, Blazquez-Llorca L, Kastanaukaite A, Rábano A, Avila J, DeFelipe J (2013) The influence of phospho-tau on dendritic spines of cortical pyramidal neurons in patients with Alzheimer's disease. *Brain* 136:1913–1928. [CrossRef Medline](#)
- Merriam EB, Millette M, Lumbard DC, Saengsawang W, Fothergill T, Hu X, Ferhat L, Dent EW (2013) Synaptic regulation of microtubule dynamics in dendritic spines by calcium, F-actin, and drebrin. *J Neurosci* 33:16471–16482. [CrossRef Medline](#)
- Mondragón-Rodríguez S, Trillaud-Doppia E, Dudilot A, Bourgeois C, Lauzon M, Leclerc N, Boehm J (2012) Interaction of endogenous tau protein with synaptic proteins is regulated by N-methyl-D-aspartate receptor-dependent tau phosphorylation. *J Biol Chem* 287:32040–32053. [CrossRef Medline](#)
- Morris M, Maeda S, Vossel K, Mucke L (2011) The many faces of tau. *Neuron* 70:410–426. [CrossRef Medline](#)
- Pooler AM, Usardi A, Evans CJ, Philpott KL, Noble W, Hanger DP (2012) Dynamic association of tau with neuronal membranes is regulated by phosphorylation. *Neurobiol Aging* 33:431.e27–431.e38. [CrossRef Medline](#)
- Rapoport M, Dawson HN, Binder LI, Vitek MP, Ferreira A (2002) Tau is essential to beta-amyloid-induced neurotoxicity. *Proc Natl Acad Sci U S A* 99:6364–6369. [CrossRef Medline](#)
- Riedl J, Crevenna AH, Kessenbrock K, Yu JH, Neukirchen D, Bista M, Bradke F, Jenne D, Holak TA, Werb Z, Sixt M, Wedlich-Soldner R (2008) Life-act: a versatile marker to visualize F-actin. *Nat Methods* 5:605–607. [CrossRef Medline](#)
- Roberson ED, Halabisky B, Yoo JW, Yao J, Chin J, Yan F, Wu T, Hamto P, Davidze N, Yu GQ, Palop JJ, Noebels JL, Mucke L (2011) Amyloid-beta/Fyn-induced synaptic, network, and cognitive impairments depend on tau levels in multiple mouse models of Alzheimer's disease. *J Neurosci* 31:700–711. [CrossRef Medline](#)
- Roberson ED, Searce-Levie K, Palop JJ, Yan F, Cheng IH, Wu T, Gerstein H, Yu GQ, Mucke L (2007) Reducing endogenous tau ameliorates amyloid-induced deficits in an Alzheimer's disease mouse model. *Science* 316:750–754. [CrossRef Medline](#)
- Selkoe DJ (2008) Soluble oligomers of the amyloid β -protein impair synaptic plasticity and behavior. *Behav Brain Res* 192:106–113. [CrossRef Medline](#)
- Sergeant N, Delacourte A, Buée L (2005) Tau protein as a differential biomarker of tauopathies. *Biochim Biophys Acta* 1739:179–197. [CrossRef Medline](#)
- Shankar GM, Bloodgood BL, Townsend M, Walsh DM, Selkoe DJ, Sabatini BL (2007) Natural oligomers of the Alzheimer amyloid-protein induce reversible synapse loss by modulating an NMDA-type glutamate receptor-dependent signaling pathway. *J Neurosci* 27:2866–2875. [CrossRef Medline](#)
- Star EN, Kwiatkowski DJ, Murthy VN (2002) Rapid turnover of actin in

- dendritic spines and its regulation by activity. *Nat Neurosci* 5:239–246. [CrossRef Medline](#)
- Steiner P, Higley MJ, Xu W, Czervionke BL, Malenka RC, Sabatini BL (2008) Destabilization of the postsynaptic density by PSD-95 serine 73 phosphorylation inhibits spine growth and synaptic plasticity. *Neuron* 60:788–802. [CrossRef Medline](#)
- Stine WB Jr, Dahlgren KN, Krafft GA, LaDu MJ (2003) In vitro characterization of conditions for amyloid-beta peptide oligomerization and fibrillogenesis. *J Biol Chem* 278:11612–11622. [CrossRef Medline](#)
- Sultan A, Nessler F, Violet M, Bégard S, Loyens A, Talahari S, Mansuroglu Z, Marzin D, Sergeant N, Humez S, Colin M, Bonnefoy E, Buée L, Galas MC (2011) Nuclear tau, a key player in neuronal DNA protection. *J Biol Chem* 286:4566–4575. [CrossRef Medline](#)
- Tai HC, Serrano-Pozo A, Hashimoto T, Frosch MP, Spires-Jones TL, Hyman BT (2012) The synaptic accumulation of hyperphosphorylated tau oligomers in Alzheimer disease is associated with dysfunction of the ubiquitin-proteasome system. *Am J Pathol* 181:1426–1435. [CrossRef Medline](#)
- Tashiro K, Hasegawa M, Ihara Y, Iwatsubo T (1997) Somatodendritic localization of phosphorylated tau in neonatal and adult rat cerebral cortex. *Neuroreport* 8:2797–2801. [CrossRef Medline](#)
- Trojanowski JQ, Schuck T, Schmidt ML, Lee VM (1989) Distribution of tau proteins in the normal human central and peripheral nervous system. *J Histochem Cytochem* 37:209–215. [CrossRef Medline](#)
- Yu JZ, Rasenick MM (2006) Tau associates with actin in differentiating PC12 cells. *FASEB J* 20:1452–1461. [CrossRef Medline](#)

Résumé

Les microtubules (MTs) sont des polymères dynamiques essentiels pour de nombreux processus cellulaires tels que la division, la migration et le transport intracellulaire. Leurs propriétés dynamiques et leur organisation spatiale sont régulées par des protéines associées, les MAPs (Microtubule-Associated Proteins). Une des premières MAPs à avoir été identifiée dans les neurones est la protéine tau, connue pour stabiliser les MTs et les organiser en faisceaux au niveau des axones. Du fait de son implication dans la maladie d'Alzheimer, tau a fait l'objet de nombreuses études et son interaction avec les MTs est aujourd'hui relativement bien caractérisée. En revanche, les mécanismes responsables de la formation des faisceaux de MTs par cette protéine restent indéterminés. Le premier objectif de ma thèse a été de définir les bases moléculaires de ce processus, grâce à la reconstitution de faisceaux de MTs *in vitro* et à leur observation en temps réel par microscopie à onde évanescente. Les résultats montrent que le domaine de projection de tau inhibe la formation des faisceaux, alors que les deux hexapeptides localisés dans le domaine C-terminal de tau et responsables de son agrégation au cours de la maladie d'Alzheimer sont essentiels à l'organisation des MTs en faisceaux. En parallèle, je me suis intéressée à l'effet de tau sur l'interaction MTs/actine. En effet, les filaments d'actine constituent, comme les MTs, un élément majeur du cytosquelette. La coordination entre les MTs et les filaments d'actine est essentielle à la différenciation et à l'activité neuronales. Cependant, les effecteurs responsables de cette coopération MTs/actine restent aujourd'hui très mal caractérisés. La protéine tau a été proposée comme pouvant s'associer directement à l'actine. De plus, elle a été observée dans des compartiments neuronaux riches en actine tels que l'extrémité des axones en croissance et les synapses, dans lesquels les microtubules peuvent entrer transitoirement. Tau est donc un potentiel intermédiaire moléculaire entre les MTs et les filaments d'actine. Grâce à la mise au point d'un système original permettant la visualisation de l'assemblage simultané des MTs et des filaments d'actine, j'ai étudié le rôle de tau dans la coordination des cytosquelettes de MTs et d'actine et également les mécanismes moléculaires sous-jacents. J'ai pu montrer que tau interagit simultanément avec les MTs et l'actine, induit le co-alignement des deux réseaux ainsi que leur croissance couplée. L'utilisation de formes tronquées de tau montre qu'au moins deux de ses quatre motifs répétés, initialement identifiés comme liant la tubuline, sont nécessaires à l'interaction entre les MTs et les filaments d'actine. Nous proposons un modèle selon lequel tau coordonne les deux cytosquelettes via la répartition de ses motifs répétés entre les deux types de polymères. J'ai également participé à une étude dans des neurones en culture, confirmant l'interaction directe de tau avec l'actine et la triple co-localisation tau/MTs/actine. L'ensemble de ces résultats nous ont donc permis d'identifier les bases moléculaires impliquées dans la formation des complexes macromoléculaires MTs/MTs et MTs/actine induits par tau.

Abstract

Microtubules (MTs) are dynamic polymers involved in fundamental cellular processes such as cell division, migration and intracellular transport. Their dynamic properties and spatial organization are regulated by numerous Microtubule-Associated Proteins (MAPs). Tau is one of the first MAPs identified in neurons and is known to stabilize MTs and organize them into bundles in axons. Due to its involvement in Alzheimer's disease, this protein has been widely studied and its interaction with MTs is now quite well characterized. However, the mechanisms by which tau organizes MTs into bundles remain to be determined. The first aim of my thesis was to define the molecular basis of MT bundling, by using *in vitro* reconstitution of MT bundles and by monitoring them in real time using evanescent wave microscopy. Results show that tau's projection domain inhibits MT bundling, whereas the two hexapeptides in the tau's C-terminal domain that are involved in tau aggregation during Alzheimer's disease are fundamental for MT organization into bundles. Furthermore I focused on the effect of tau on the crosstalk between MTs and actin. Actin filaments are another major cytoskeletal elements. The coordination between MTs and actin filaments is essential for neuronal differentiation and activity. However, the effectors responsible for MTs/actin cooperation remain poorly characterized. Tau protein has been proposed to directly interact with actin filaments. Besides, tau has been observed in neuronal actin-rich compartments like the extremity of growing axons and synapses, in which MTs can enter transitorily. Thus tau appears as a potential molecular linker between MTs and actin filaments. By developing an original cell-free system to visualize concomitant MTs and actin assembly, I studied the role of tau in the coordination of MTs and actin filaments and characterized the underlying molecular mechanisms of this phenomenon. I showed that tau is able to interact simultaneously with MTs and actin filaments, inducing the co-alignment of both polymers and their coupled growth. By using truncated tau proteins, I showed that at least two of the four tau's repeat motifs, initially characterized to bind tubulin, are necessary for the MTs/actin interaction. We propose a model in which tau coordinates the two networks through the distribution of its repeat motifs between the two polymers. I also participated to a study in cultured neurons, which confirmed the direct association of tau with actin and a triple co-localization between MTs/actin and tau. Altogether, these results led us to identify the molecular basis involved in the formation of MTs/MTs and MTs/actin macromolecular complexes induced by tau.