



Etude in vitro des effets de la protéine MAP6 sur le cytosquelette

Maxime Seggio

► To cite this version:

Maxime Seggio. Etude in vitro des effets de la protéine MAP6 sur le cytosquelette. Neurobiologie. Université Grenoble Alpes, 2016. Français. NNT : 2016GREAV063 . tel-01685705

HAL Id: tel-01685705

<https://theses.hal.science/tel-01685705>

Submitted on 16 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 LA COMMUNAUTE UNIVERSITE GRENOBLE ALPES

Spécialité : CSV/Chimie Biologie

Arrêté ministériel : 7 août 2006

Présentée par

Maxime SEGGIO

Thèse dirigée par **Annie ANDRIEUX** et
codirigée par **Christian DELPHIN**

préparée au sein du **Laboratoire « Physiopathologie du Cytosquelette »** à l'**Institut des Neurosciences de Grenoble**
dans l'**École Doctorale Chimie et Science du Vivant**

Etude *in vitro* des effets de la protéine MAP6 sur le cytosquelette.

Thèse soutenue publiquement le **29 Juin 2016**,
devant le jury composé de :

Mr, Alain, BUISSON

Professeur à l'Université Grenoble Alpes, Président

Mme, Marylin, VANTARD

Directrice de recherche à l'Institut des Neurosciences de Grenoble,
Membre

Mr, Mathieu, PIEL

Chef d'équipe à l'institut Curie (Paris), Rapporteur

Mme, Karine, MONIER

Ingénierie d'études au laboratoire Joliot-Curie (Lyon), Rapporteur

Mr, François, DEVRED

Chercheur et Maître de conférence au Centre de Recherche en
Oncobiologie et Oncopharmacologie (Marseille), Membre

Mme, Annie, ANDRIEUX

Chef d'équipe à l'Institut des Neurosciences de Grenoble, Membre

Mr, Christian, DELPHIN

Chercheur à l'Institut des Neurosciences de Grenoble, Invité



Remerciements

Je tiens tout d'abord à remercier ma directrice de thèse, Annie Andrieux, et mon co-directeur de thèse, Christian Delphin, pour m'avoir accueilli au sein de leur équipe et pour leur encadrement au cours de ma thèse. Je les remercie pour leur disponibilité, leur aide précieuse, leurs conseils et leurs enseignements, en particulier en biochimie, m'ayant permis d'évoluer dans ce domaine. Merci aussi pour les discussions fructueuses sur ce projet de thèse et pour l'aide apportée au cours de la rédaction de ce manuscrit.

Je remercie également les différents membres de mon jury de thèse pour m'avoir fait l'honneur de rapporter mon travail et manuscrit de thèse : Pr. Alain Buisson, Dr. Marylin Vantard, Dr. François Devred, Dr. Karine Monier et Dr. Mathieu Piel.

Merci aux membres de mon équipe « Physiopathologie du Cytosquelette » pour leur aide, leurs conseils et pour leur soutien quotidien : merci Lety pour ta gentillesse et ta bonne humeur, Jean-Marc pour ton soutien, les petites discussions sympathiques que nous avons pu avoir et ta franchise. Merci aussi à Christophe et Eric pour leur aide scientifique en biologie moléculaire mais aussi en informatique, pour la mise au point de macros qui ont été d'une aide précieuse. Merci aussi pour votre joie de vivre qui égayait les couloirs du GIN.

Je tiens également à remercier dans l'équipe voisine Isabelle Arnal pour son aide tout au long de ma thèse, pour ses renseignements précieux sur les microtubules et pour avoir toujours répondu présente à la moindre de mes questions, ainsi que pour m'avoir formé aux différentes techniques de vidéomicroscopie. Merci aussi aux autres membres de cette équipe avec lesquels il a toujours été un plaisir de discuter, de rire et travailler, comme à l'occasion des inoubliables purifications de cervelles de bœufs.

Je remercie aussi mes collègues de bureau, Charlotte, Vincent, Marine, Marc et Joseph avec qui nous avons pu parler de tout et de rien, dans la rigolade et toujours de bonne humeur. Merci pour cette ambiance convivable que nous avons partagée pendant 3 ans.

Merci à tous mes amis, Flora, Antoine, Loïc, Benoît, Romain (on va s'en sortir), Gaëlle et Ju. Merci pour votre soutien, tous nos fous rires, nos petites soirées conviviales et nos discussions qui ont réussi à me laisser un pied hors du monde scientifique.

Enfin merci à ma famille, en particulier mes parents, mon frère et ma sœur pour m'avoir épaulé, soutenu moralement et pour avoir pris soin de moi physiquement en s'assurant de bien m'envoyer chez le medecin quand cela était nécessaire et même quand cela l'était beaucoup moins. Merci aussi pour les petits plats lors des soirs où la motivation pour préparer à manger était restée au labo. Enfin je terminerai en remerciant Auréliane pour tous les bon moments que nous avons partagés, les sorties jusqu'à tard dans la nuit dans des endroits toujours insolites qui resteront inoubliables et qui m'ont offert une évasion hors des murs du laboratoire. Merci aussi à la patissière dont les tartes aux citrons et les divers gâteaux m'ont offert un réconfort et un soutien psychologique lors des moments de stress. Merci aussi pour les discussions scientifiques que nous avons eu (malgré tes doutes sur mes microtubules tordus, et non je suis désolé de te décevoir mais Tau ne tord pas les microtubules comme MAP6 ^^) et qui ont permises d'approfondir également un peu mon projet, pour tes relectures minutieuses et ton aide lors de la rédaction et la préparation de ma soutenance. Merci encore à vous tous pour votre présence.

Avant-propos

Le cytosquelette d'une cellule eucaryote est constitué de différents polymères biologiques qui lui confèrent l'essentiel de ses propriétés mécaniques tel que le maintien de l'architecture de cette dernière ou la modification de sa forme pour se déplacer. Ils sont également impliqués dans le transport d'organites ou de nutriments d'un bout à l'autre de la cellule ou encore dans la ségrégation des chromosomes lors de la mitose ainsi que dans le processus de division cellulaire.

Différents types de filaments existent afin de répondre aux différents besoins de la cellule et sont ainsi classés en trois catégories : les filaments d'actine impliqués par exemple dans la motricité cellulaire, les filaments intermédiaires, les éléments les moins dynamiques du cytosquelette et qui jouent un rôle essentiel dans la force mécanique et les MTs, important dans le transport intracellulaire, la mitose et le positionnement des organites. Chacun de ces polymères présentent une dynamité et une persistance qui varie en fonction de leur rôle dans la cellule.

Les polymères vont ainsi s'organiser en réseaux ou en faisceaux et la structure de ces derniers va être affectée par la présence de tout un jeu de protéines accessoires, qui peuvent modifier les propriétés intrinsèques des différents filaments (dynamique, mécanique et organisatrice).

Les polymères résultent de l'assemblage de sous-unités de base , de plus petites tailles, diffusables beaucoup plus rapidement dans le cytoplasme au contraire des filaments, permettant une réponse rapide aux besoins de la cellule par désassemblage et résassemblage.

Dans ce contexte, le but de mon travail a été d'étudier les effets d'une de ces protéines accessoires capable de modifier les propriétés des filaments, la protéine MAP6 (Microtubules Associated Protein 6), initialement identifié comme protéine stabilisatrice des microtubules au froid (Bosc et al., 1996). Je me suis également intéressé aux effets de la protéine MAP6 sur un autre composant du cytosquelette, l'actine.

Dans l'introduction de ce manuscrit, nous débuterons par une description des microtubules, de leur structure et de leur dynamique ainsi que les effecteurs capables d'influencer le comportement du microtubule. Puis nous rentrerons plus en détails sur la protéine MAP6 et sa structure ainsi que ses effets déjà connus sur les microtubules et son implication dans les troubles neurologiques et comportementaux observés chez les souris KO MAP6. Enfin nous détaillerons aussi un autre élément du cytosquelette, les filaments d'actine, qui se sont avérés également être une cible de la protéine MAP6.

L'étude de l'activité de la protéine MAP6 a été réalisée *in vitro* par différentes approches vidéomicroscopiques et biochimiques.

Sommaire

| | |
|--|----|
| A. INTRODUCTION..... | 1 |
| I Les Microtubules..... | 3 |
| 1. Dimère de tubuline..... | 3 |
| 2. La structure des Microtubules..... | 4 |
| 3. Mécanique des microtubules | 7 |
| 4. Structure dynamique..... | 8 |
| <i>a Nucléation.....</i> | 8 |
| <i>b élongation.....</i> | 11 |
| <i>c L'instabilité dynamique des MTs.....</i> | 13 |
| II La régulation de la dynamique des MTs..... | 19 |
| 1 les MAPs stabilisatrices classiques..... | 19 |
| <i>a MAP de type I : MAPI.....</i> | 19 |
| <i>b MAP de type 2 : MAP2.....</i> | 22 |
| <i>c La protéine Tau.....</i> | 24 |
| <i>d La protéine Doublecortine (DCX)</i> | 26 |
| <i>e La protéine MAP6 aussi appelée STOP (Stable tubule only peptide).....</i> | 27 |
| 2. Les facteurs de déstabilisation des microtubules..... | 28 |
| 3. Les moteurs moléculaires..... | 29 |
| <i>a les kinésines.....</i> | 29 |
| <i>b les dynéines.....</i> | 29 |
| 4. Les + TIPs..... | 30 |
| <i>a Les protéines du bout (+).....</i> | 30 |
| <i>b Les protéines du bout (-).....</i> | 33 |
| III Les Protéines MAP6..... | 37 |
| 1. Les différentes isoformes et leurs fonctions..... | 37 |
| <i>a Les protéines MAP6-N et MAP6-E.....</i> | 37 |
| <i>b Les isoformes non neuronales.....</i> | 40 |
| 2. Les différents domaines de la protéine MAP6..... | 41 |
| <i>a Domaines de liaison et stabilisation aux microtubules.....</i> | 41 |
| <i>b Domaines de liaison à la calmoduline.....</i> | 41 |
| <i>c Sites de phosphorylation</i> | 42 |
| <i>d Sites de palmitoylation</i> | 43 |

| | |
|---|-----------|
| 3. La souris invalidée pour la protéine MAP6..... | 44 |
| <i>a Défauts Anatomiques.....</i> | 44 |
| <i>b Altération du système glutamatergique, dopaminergique et serotoninergique.....</i> | 44 |
| <i>c Altération du comportement.....</i> | 45 |
| <i>d Implication des microtubules dans la pathologie.....</i> | 45 |
| IV Actine..... | 47 |
| 1. Monomère d'Actine..... | 47 |
| 2. La structure du filament d'actine..... | 48 |
| 3. Protéines régulatrices de l'actine..... | 51 |
| <i>a Les protéines nucléatrices.....</i> | 52 |
| <i>b Protéines séquestratrices de l'actine.....</i> | 52 |
| <i>c Protéines déstabilisatrices.....</i> | 53 |
| <i>d Protéines architecturales de l'actine.....</i> | 54 |
| B. OBJECTIFS DE LA THESE..... | 57 |
| C. RESULTATS..... | 61 |
| I Article 1..... | 63 |
| II Article 2..... | 67 |
| III Article 3..... | 71 |
| IV Résultats Actine..... | 75 |
| 1. Contexte..... | 77 |
| 2. Résultats..... | 79 |
| 3. Conclusion..... | 83 |
| 4. Matériel et méthodes Actine..... | 84 |
| D. DISCUSSION GENERALE..... | 89 |
| E. BIBLIOGRAPHIE..... | 99 |

Abréviations

+/-TIP : Microtubule plus/minus end tracking protein

ABP : Actin Bondong Protein

Actine F : Actine Filamenteuse

Actine G : Actine Globulaire

ADF : Actin Depolymerizing Factor

ADNc : Acide Désoxyribonuléique complémentaire

APC : Adenomatous Polyposis Coli

ARNm : Acide Ribonucléique messenger

Arp2/3 : Actin related protein 2/3 complex

Ca : Calcium

CamKII : Calmodulin dependent protein Kinase II

CAMSAP : Calmodulin-Regulatd Spectrin-Associated Protein

Cdc42 : Cell division control protein 42

CLASP : CLIP-Associated Protein

CLIP : Cytoplasmic Linker Protein

cryo-EM : cryo-electron Microscopy

DCX : Doublecortine

DIC : Differential Interference Contrast

EB : End Binding protein

GDP : Guanosine Di-Phosphate

GMPCPP : Guanosine-5'-[(α,β) -methyleno]triphosphate

GTP : Guanosine Tri-Phosphate

GTP γ S : Guanosine 5'-(γ -thio)triphosphate

IQGAP : IQ motifs and GTPase activating protein (GAP)

JNK : Jun N-terminal Kinase

KO : Knock Out

LTD : Long-term depression

LTP : Long-term potentiation

MAP : Microtubule Associated Protein

MARK :MAP/microtubule affinity-regulating kinase

MCAK : Mitotic Centromere Associated Kinesin)

Mg : Magnésium

MT : Microtubule

PH : Potentiel Hydrogène

PKA : Protein Kinase A

PRD : Proline-rich domain

Rac : Ras-related C3 botulinum toxin substrate 1

Ser : Sérine

SH3 : SRC Homology 3 Domain

STOP : Stable Tubule Only Peptide

Tau : Tubulin associated unit

TBCE : Tubulin-Specific Chaperone E

Thr : Thréonine

TIRF : Total Internal Reflection Fluorescence

TURC : Tubulin Ring Complex

TUSC : Tubulin Small Complex

WASP : Wiskott-Aldrich Syndrome family Protein

XKCM1 : Xenopus Kinesin Catastrophe Modulator-1

INTRODUCTION

I Les Microtubules

1. Dimère de tubuline

Les microtubules résultent de l'assemblage de la tubuline, une protéine hétérodimérique constituée de deux sous-unités globulaires α et β de 450 acides aminés. Chaque sous-unité possède un site de fixation dans sa partie N-terminale au nucléotide GTP, site hydrolysable et échangeable sur la sous-unité β (qui peut être lié au GTP ou GDP) et un site non-échangeable sur la sous-unité α (lié de façon permanente au GTP). La structure de l'hétérodimère obtenue par crystallographie grâce à l'auto-assemblage de feuillets de MTs en présence de zinc et stabilisés par du taxol (Nogales et al., 1998) montre une homologie structurale entre les sous-unités α et β , avec une composition à 39% d'hélices α , de 18% de feuillets β (figure 1).

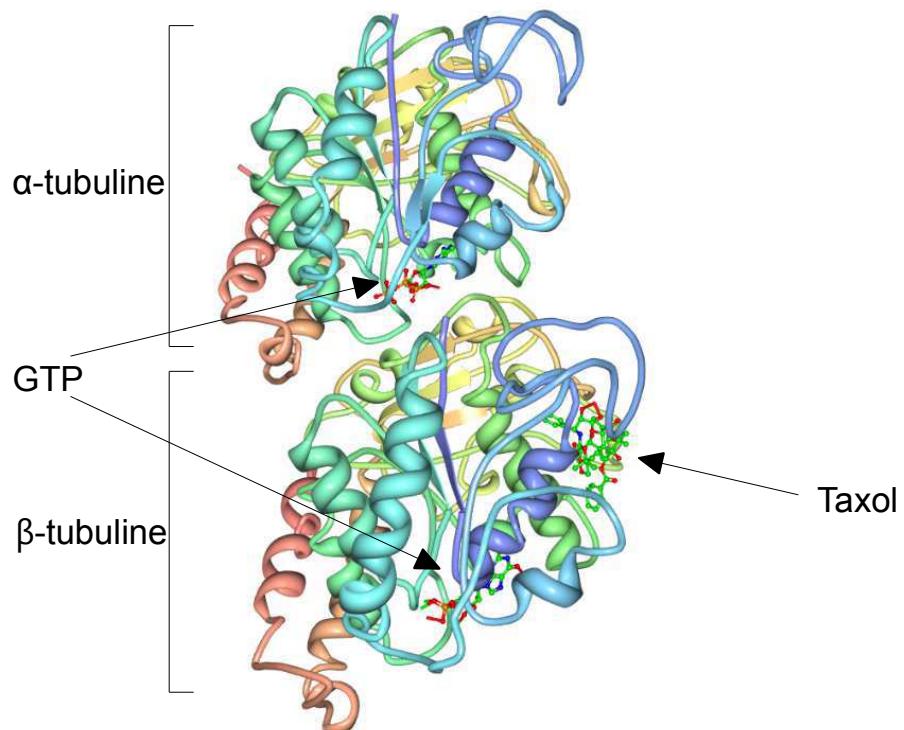


Figure 1 : Représentation tri-dimensionnelle de la structure du dimère de tubuline.

Chaque monomère possède un site de liaison au GTP mais le GTP de la sous-unité α est piégée et non-hydrolysable. La sous-unité β possède un site de liaison au taxol. (adapté de Nogales et al., 1998).

Le dimère de tubuline peut classiquement se diviser en trois parties : une partie N-terminale contenant le site de liaison au GTP ou au GDP, une partie intermédiaire avec un site de liaison au taxol (drogue stabilisatrice des microtubules) et une partie C-terminale exposée à l'extérieur du dimère et qui va également former une arrête sur la face externe du MT qui va subir des modifications post-traductionnelles lui permettant une interaction avec d'autres protéines (Nogales et al., 1999).

2. La structure des Microtubules

Les MTs sont des fibres constitutives du cytosquelette pouvant atteindre plusieurs centaines de microns et consistent en un tube creux d'un diamètre de 25 nm. Ils résultent de l'association non-covalente d'hétérodimères d' α et β tubuline. Ces hétérodimères vont s'associer bout à bout pour former une structure intermédiaire polarisée, le protofilament. Les protofilaments s'associent par la suite de façon latérale pour former un feuillet qui va finir par se refermer pour former le MT creux, le lieu de fermeture formant ainsi le *sillon* du MT. Du fait de l'hétérogénéité du dimère de tubuline et de leur assemblage, le MT présente une structure polarisée avec une extrémité (+) exposant la sous-unité β et une extrémité (-) exposant la sous-unité α (Mitchison, 1993 ; Fan et al., 1996). L'existence de cette polarité induit une cinétique d'assemblage différente entre les deux extrémités du MT, l'extrémité (+) étant beaucoup plus dynamique que l'extrémité (-) (Figure 2).

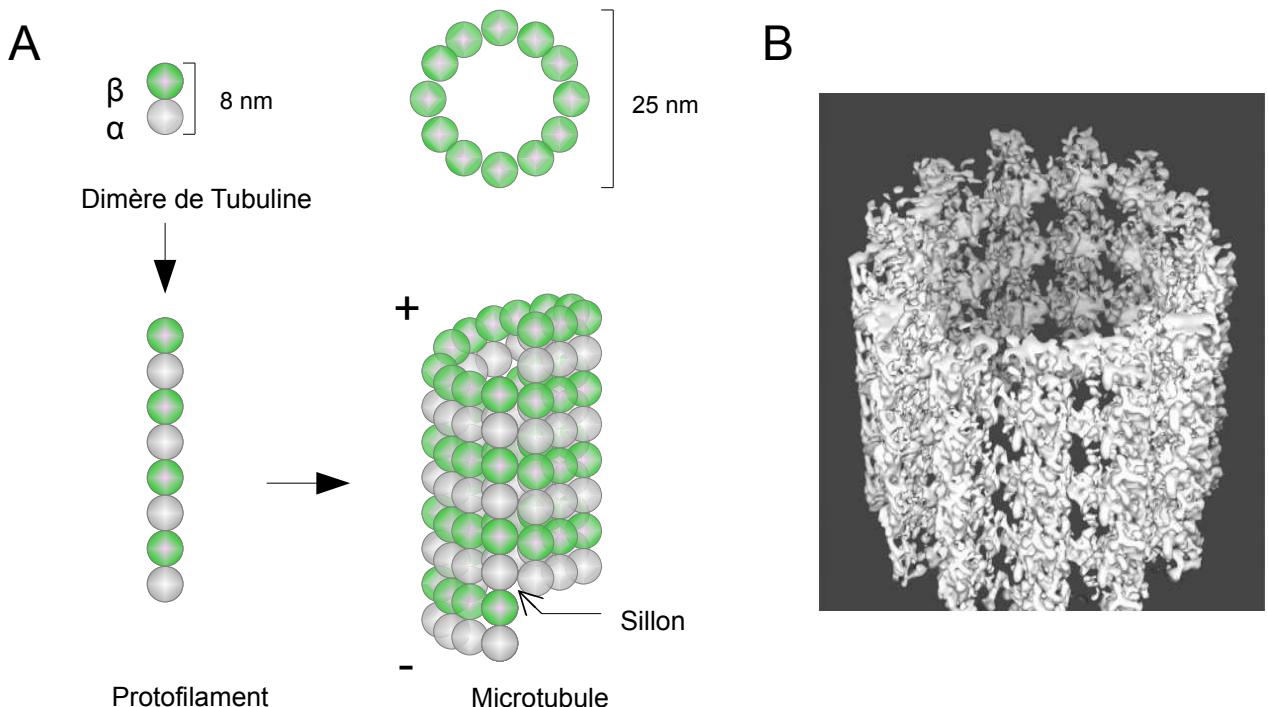
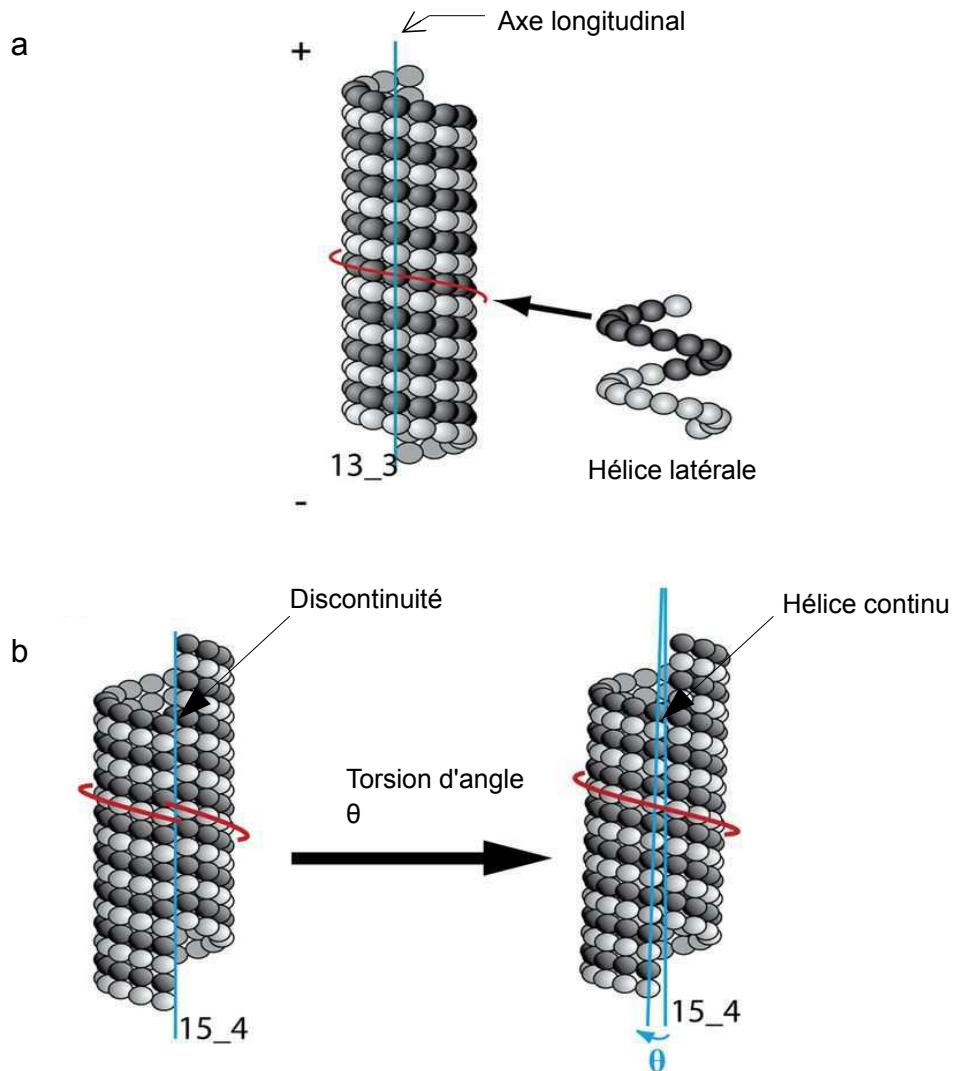


Figure 2 : Structure du MT.

Schéma d'un dimère de tubuline constitué d'une sous-unité α et β . A : Les dimères s'associent ensuite de façon longitudinal pour former la sous-structure du MT, les protofilaments qui vont s'associer latéralement pour former un feuillet qui va se refermer pour former un tube de 25nm de diamètre, le MT, en formant une ligne de suture, le sillon. B : Reconstruction 3D d'un MT à partir d'images de cryo-microscopie (adaptée de Li et al., 2002).

Dans la cellule, le nombre de protofilaments qui constitue un MT est majoritairement 13 protofilaments (Tilney et al., 1973). Les protofilaments s'assemblent parallèlement à l'axe d'elongation du MT. Chaque protofilament est décalé longitudinalement par rapport à son voisin d'environ 0,9 nm de façon à ce que les monomères de tubuline décrivent des hélices latérales à la surface du MT (Figure 3a). Ainsi pour un microtubule à 13 protofilaments, il faut 3 hélices latérales pour reconstituer la totalité du microtubule, définissant ainsi le nombre « s » ou encore *start* du microtubule, qui sera alors qualifié de MT 13_3.



In vitro, le nombre de protofilaments qui compose le MT est beaucoup plus variable et peut ainsi aller de 9 à 17, bien que ceux-ci sont principalement constitués de 13 ou 14 protofilaments (Chrétien et Wade, 1991). De plus, ce nombre peut également varier au sein d'un même MT (Chrétien et al., 1992). Cependant, dans le cas de MTs où le nombre de protofilaments est différent de 13, cela induirait lors de la fermeture du *sillon* une discontinuité physique et donc une cassure de l'hélice latérale. Cette discontinuité est corrigée par une torsion du microtubule induisant de par ce fait un stress mécanique dans la paroi du MT suivant l'axe d'elongation formant ainsi un angle (θ) afin de permettre une fermeture correcte du feuillet du MT et de garder un réseau de surface hélicoïdale (Wade et al., 1990 ; Chretien et Wade, 1991, Chrétien et Fuller, 2000 ; Hunyadi et al., 2005). Selon l'angle de la torsion (θ), les protofilaments forment ainsi une hélice droite ou gauche tout du long du MT (figure 3b). Cette discontinuité peut également être compensée par une modification du nombre « s » en formant des microtubules avec 2 ou 4 hélices latérales.

La détermination du nombre de protofilaments au sein du MT peut être obtenu par cryo-EM en analysant le contraste spécifiques des franges à la surface du MT résultant de la superposition en projection 2D des protofilaments (figure 4). Ainsi dans le cas d'un MT 13_3, où les protofilaments sont parallèles à l'axe d'elongation du MT, les franges apparaissent continues au contraire de microtubules dont les protofilaments sont vrillés auquel cas l'on observe une alternance du nombre de franges, caractéristiques de la composition du MT (nombre de protofilaments / « s »).

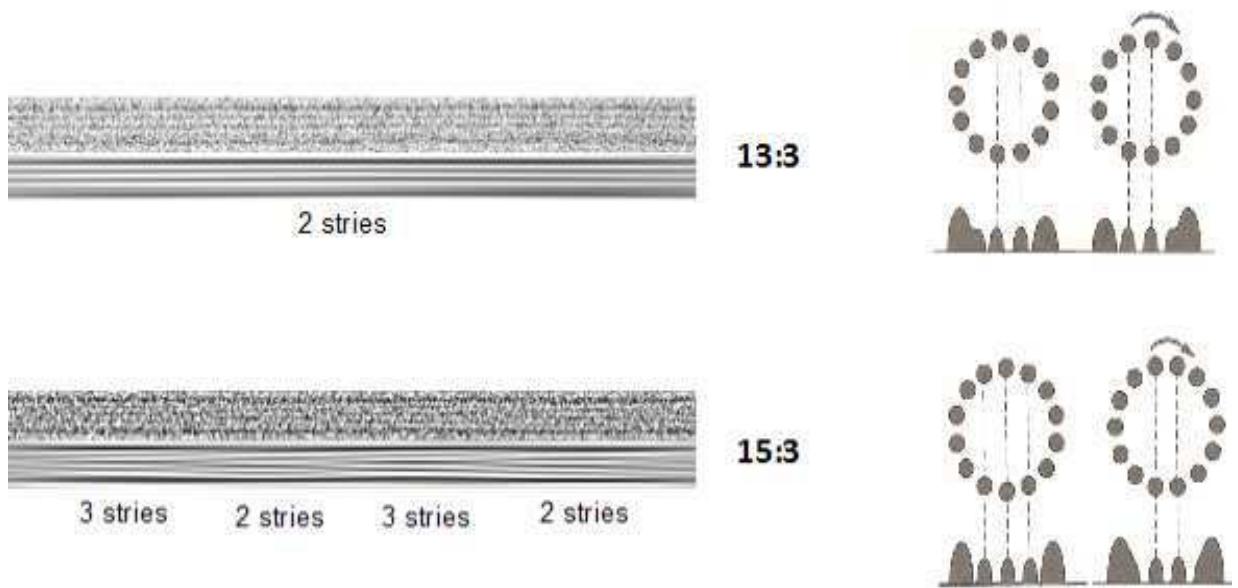


Figure 4 : Alternance de franges à la surface du MT.

Formation différente du nombre de franges à la surface du MT en fonction du nombre de protofilaments dus à la présence ou absence d'angle de torsion. (Adaptée de Chrétien et al, 1992)

3. Mécanique des microtubules

Les microtubules sont des éléments structuraux essentiels des cellules. Ils jouent un rôle important dans la morphologie et le maintien de la forme de la cellule mais aussi dans la motilité cellulaire et le transport. Les différents éléments du cytosquelette montrent une rigidité différente, pouvant être caractérisée de plusieurs manières, l'une d'entre elles étant la longueur de persistance, qui définit la longueur au-delà de laquelle les microtubules sont déformables sans observer de ruptures. Celle-ci peut être obtenue de différentes façons, soit de façon passive en forçant la courbure des microtubules par fluctuation thermique, soit de façon active comme par exemple l'utilisation d'un flux de façon à courber mécaniquement le polymère (Gittes et al., 1993). En adéquation avec leur rôle structural, les microtubules sont les éléments les plus rigides des éléments du cytosquelette dans la cellule du à leur assemblage en tube de dimère de tubuline. Cependant, les microtubules peuvent se retrouver dans des conformations extrêmement courbées *in vivo* capable de montrer des courbures importantes sur de faible distance. Un des exemples de l'importance des microtubules d'être capable de se déformer est la formation des faisceaux de MTs. La formation de faisceaux à de grands angles de rencontres est facilitée dans le cas où les MTs sont plus flexibles de façon à permettre le co-alignement (Shaw et al., 2003 ; Dixit et Cyr., 2004). Dans les cellules végétales les microtubules sont également capable de se tordre pour longer et suivre la membrane plasmique.

Au sein d'une cellule, le comportement mécanique du microtubule va être régulé de façon à répondre à ses besoins (Brangwynne et al., 2006 ; Wasteneys, 2009). En effet différents facteurs sont capable de modifier la rigidité des MTs. Il a ainsi été montré que certaines MAPs sont capable d'altérer cette flexibilité. Les MAPs les plus étudiés étant les MAPs neuronales Tau et MAP2 qui ont été montrées comme étant capable de rigidifier les MTs (Dye et al., 1993 ; Mickey et Howard, 1995 ; Felgner et al., 1997). La protéine MAP65 permet quant-à-elle de rendre les microtubules plus flexibles (Portran et al., 2013).

L'état de la tubuline joue également un rôle dans la flexibilité des microtubules. Liés au GTP, les dimères de tubuline permettent une conformation plus stable et rigide des protofilaments que lorsque la tubuline est sous forme GDP, qui a tendance à courber les protofilaments et augmenter la flexibilité du microtubule (Elie-Caille et al., 2007).

D'autres facteurs comme la température ou encore l'utilisation de drogue peuvent également être responsable d'une modulation de la rigidité du microtubule. Dans le premier cas, il a été montré qu'une augmentation de la température était corrélée avec une augmentation de la flexibilité qui serait éventuellement liée à une accélération du processus

d'hydrolyse du GTP en GDP (Kawagushi et al., 2008 ; Kawagushi et al., 2010). Dans le second cas, certaines drogues peuvent modifier le comportement mécanique du MT. Le taxol a par exemple été considéré dans un premier temps comme étant capable d'augmenter la flexibilité des microtubules (Dye et al., 1993 ; Felgner et al., 1996), cependant depuis il est accepté qu'au contraire que le taxol permettrait d'augmenter sa rigidité (Dye et al., 1993 ; Mickey et Howard, 1995 ; Mitra et al., 2008).

Enfin la vitesse de polymérisation et la longueur du MT sont aussi impliquées dans la flexibilité. Plus la vitesse de polymérisation est grande et plus le MT est flexible, ce qui serait expliquée par l'apparition de défauts dans la paroi du MT, réduisant ainsi sa rigidité (Janson et Dogterom, 2004). Mais d'autre part et de façon surprenante, il a également été montré que plus le microtubule est grand, est plus celui-ci est rigide, ce qui serait expliqué par le fait que les interactions longitudinales entre les dimères de tubuline sont plus fortes que les interactions latérales entre les protofilaments (Pampaloni et al., 2006).

4. Structure dynamique

a Nucléation

In vitro, la nucléation des MTs débute par une étape d'oligomérisation de la tubuline énergétiquement défavorable et lente, qui peut être passée par la présence de centre de nucléation, comme les axonèmes par exemple. La nucléation et l'assemblage des MTs dépend de nombreux facteurs (Inoué et Sato, 1967 ; Gaskin et al., 1974 ; Olmsted et Borisy 1975) incluant la présence de nucléotide GTP, de Mg²⁺, l'absence de Ca²⁺ (qui induit la dépolymérisation des microtubules), une température autour de 35°C ainsi qu'un PH proche du PH Physiologique. En l'absence de centre de nucléation, la nucléation des MTs peut s'effectuer de manière spontanée mais est fortement dépendante de la concentration dans le milieu de Tubuline-GTP à partir de laquelle les MTs commencent à s'autoassembler, concentration seuil alors appelée concentration critique (Fygenson et al., 1995 ; Caudron et al., 2000). Deux modèles sont proposés pour expliquer le mécanisme d'autoassemblage des MTs. Dans le premier, les dimères de tubuline s'associent bout à bout pour former des protofilaments, protofilaments qui vont ensuite s'associer en feuillet pour former un noyau de nucléation. L'ajout de dimère de tubuline de façon latéral et longitudinal va permettre ensuite la fermeture du feuillet pour former un microtubule (Voter et Erickson, 1984 ; Flyvbjerg et al., 1996 ; revue Job et al., 2003) (figure 5 a). Le second modèle propose l'association latérale de dimères de tubuline pour former un oligomère de tubuline. Ces oligomères vont ensuite s'associer de façon longitudinale pour former comme dans le premier modèle un feuillet qui va finir par se fermer pour former le MT (Caudron et al., 2000) (figure 5 b).

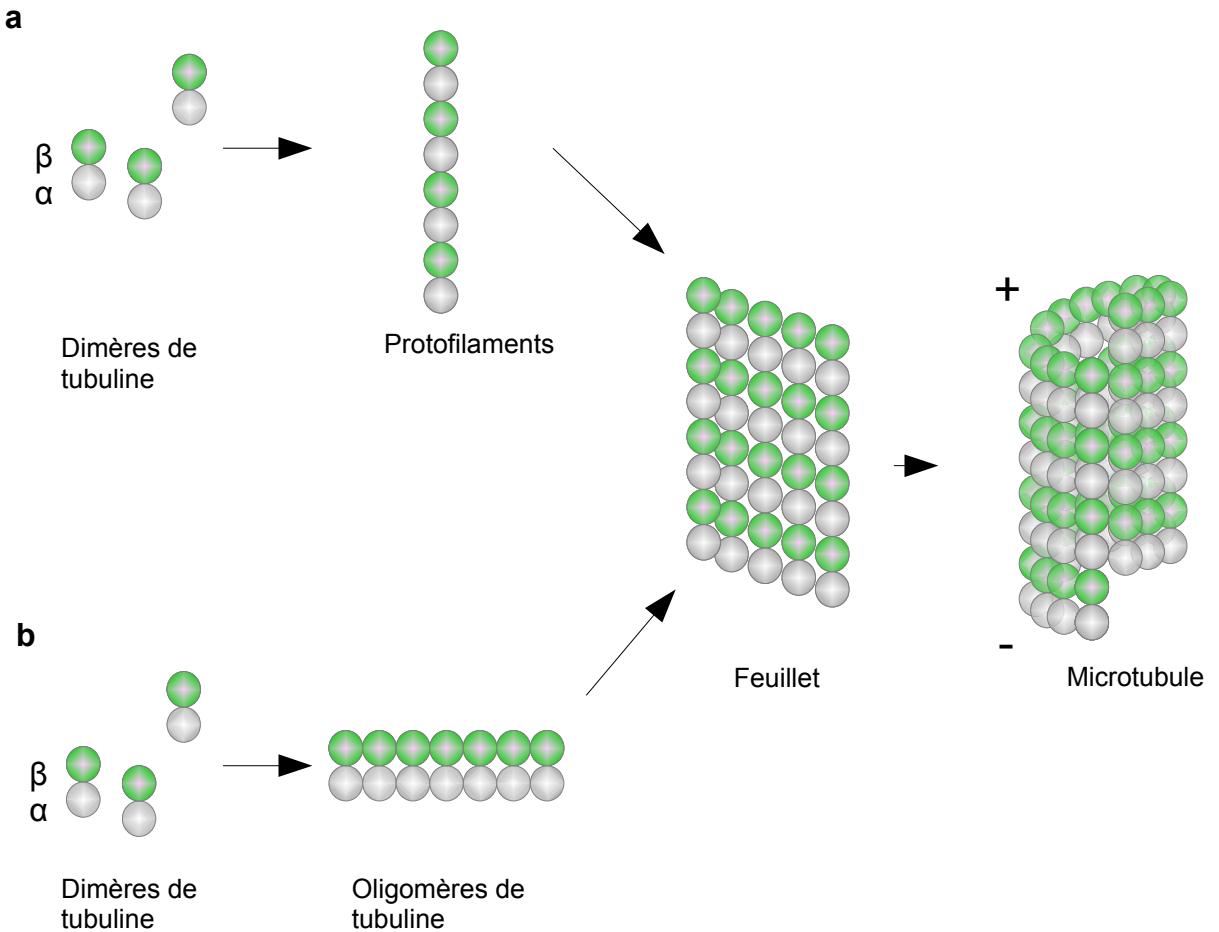


Figure 5 : Modèles de nucléation des microtubules.

a. Modèle de nucléation à partir d'un noyau de nucléation sous forme de protofilaments permettant la formation d'un feuillet. b. Modèle de nucléation sous forme d'oligomères de tubuline obtenus par association latérale des dimères de tubuline.

De manière générale, dans la cellule, la concentration de tubuline est trop faible pour permettre la nucléation spontanée. Les microtubules polymérisent principalement à partir de centre de nucléation comme le centrosome et ainsi de façon radiale dans la cellule. Le centrosome concentre une isoforme particulière de la tubuline, la tubuline γ permettant ainsi à la cellule de maîtriser la nucléation et la localisation des MTs (Mitchison et Kirschner, 1984 ; Soltys et Borisy, 1985 ; Oakley et al., 1990). La tubuline γ s'associe avec d'autres protéines pour former un macro complexe d'environ 2-MDa : le complexe γ -TuRCs (γ -Tubulin Ring Complexes) (Moritz et al., 1995 ; Zheng et al., 1995), qui va servir de plateforme de nucléation au MT. Ainsi pendant longtemps il a été admis que les microtubules polymérisaient quasiment en totalité à partir du centrosome (Figure 6).

Cependant cette nucléation radiale ne permet pas une organisation idéale du réseau microtubulaire dans des cellules spécialisées. Il a ainsi été montré l'existence d'une autre population de microtubules qui polymérisent quant-à-eux à partir de vésicules golgiennes et qui permettrait ainsi une association directe entre le réseau de microtubules et le transport de vésicules golgiennes au sein de la cellule (Chabin-Brion et al., 2001 ; Efimov et al., 2007 ; Miller et al., 2009 ; Vinogradova et al., 2012 ; Oddoux et al., 2013). Cette nucléation a été caractérisée dans de nombreux types cellulaires comme les hepatocytes, les cellules épithéliales, les cellules musculaires ou encore les neurones (Chabin-brion et al., 2001 ; Efimov et al., 2007 ; Zaal et al., 2011 ; Ori-Mckenney et al., 2012). L'appareil de golgi posséderait ainsi dans sa membrane des protéines d'ancre de la tubuline γ et mimeraient ainsi le centrosome (Rivero et al., 2009 ; Roubin et al., 2013, Oddoux et al., 2013), l'absence de ces protéines entraînant une réduction de la quantité de microtubules polymérisant à partir de l'appareil de golgi. La concentration de γ tubuline dans l'appareil de golgi étant faible, d'autres protéines vont par la suite stabiliser et faciliter la polymérisation des microtubules. C'est le cas de la protéine chaperone de la tubuline TBCE qui va permettre d'augmenter localement la concentration de dimère de tubuline dans le golgi au niveau des « hots spots » de tubuline (Schaefer et al., 2007 ; Bellouze et al., 2014) ou encore des protéines du bout (+) des microtubules comme les protéines CLASPs ou EB1 retrouvées également dans le golgi pour promouvoir et réguler la polymérisation (Efimov et al., 2007 ; Roubin et al., 2013 ; Wang et al., 2014).

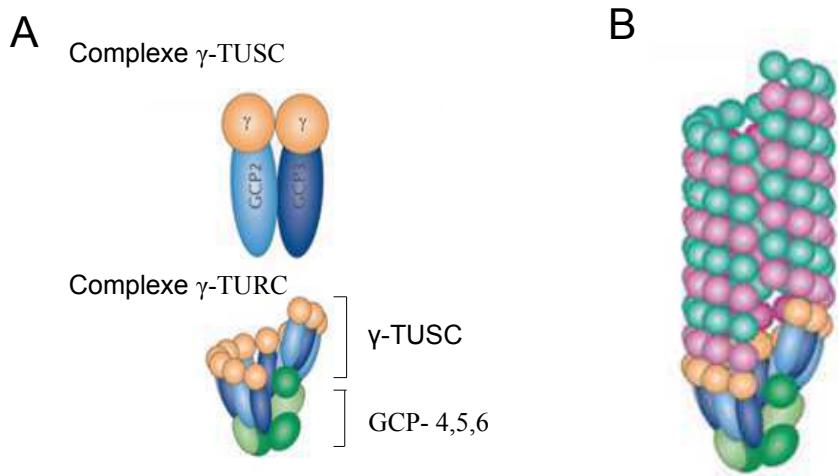


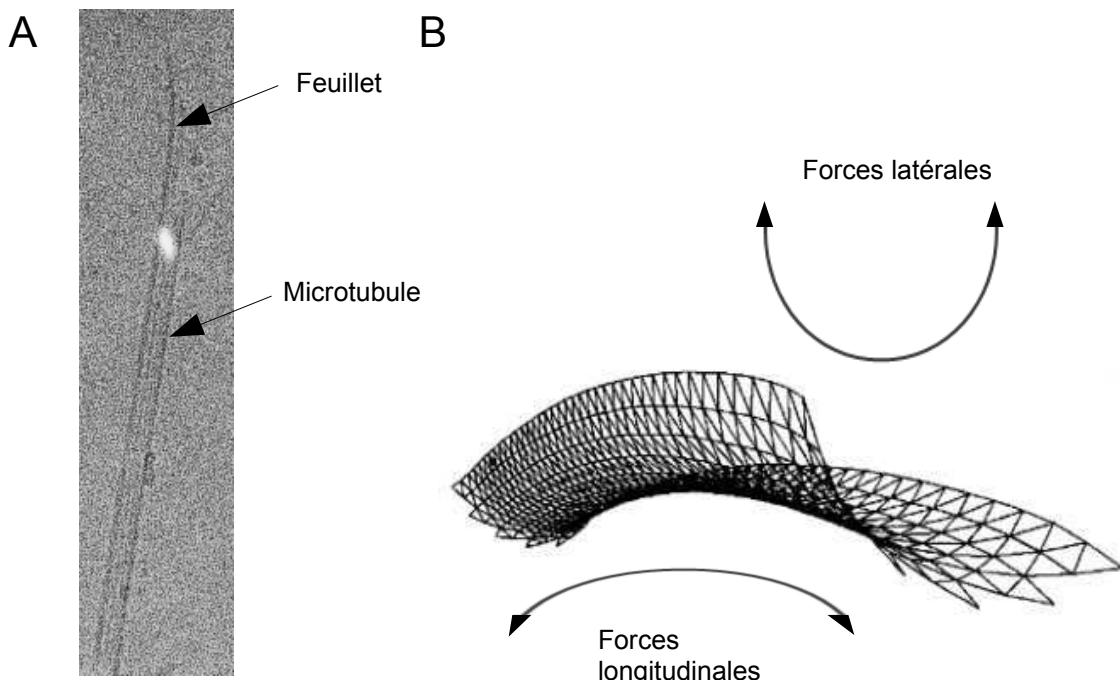
Figure 6 Complexé d'assemblage et modèle d'assemblage.

A haut : représentation schématique du complexe gamma-TUSC constitué des sous-unités GCP2 et 3 chacune associées à une gamma-tubuline. En bas est représenté l'assemblage du complexe gamma-TURC constitué de l'assemblage de différents complexes gamma-TUSC qui vont s'associer avec les GCP 4,5 et 6 pour former une structure circulaire permettant de servir de centre de nucléation aux MTs en B (Modèle couramment accepté). Adaptée de Kollman et al., 2011.

b elongation

Une fois les premières étapes de nucléation amorcées, les amorce de MTs nouvellement formées vont progressivement s'allonger par ajout de dimère de tubuline-GTP aux extrémités du MT *in vitro* (côté + et côté -). Deux modèles existent pour expliquer l'elongation du MT. Le premier propose l'ajout de façon hélicoïdale de dimère de tubuline à l'extrémité du microtubule tandis que le second propose la formation d'un feuillet à l'extrémité du MT qui se fermerait par la suite naturellement le long du *sillon* (Mandelkow et al., 1991 ; Chretien et al., 1995). *In vitro*, le second modèle est couramment admis, des études de microscopie électronique ayant montré la croissance du MT par extension des protofilaments en forme de feuillet et il a aussi été observé dans des extraits cellulaires et des cellules (figure 7) (Arnal et al., 2000 ; Hoog et Anthony, 2007 ; Koning et al., 2008). Ce modèle mettrait en jeu deux forces opposées, une force longitudinale le long du protofilament tendant à le courber vers l'extérieur, et une force transversale due à l'association latérale entre les protofilaments. Cette dernière augmenterait avec le nombre de protofilaments jusqu'à les redresser et permettre en définitif la fermeture du feuillet (Jánosi et al., 1998) (Figure 7).

La polymérisation de la tubuline en MT requiert la présence de GTP sur la sous-unité β , qui sera hydrolysé lors de l'assemblage. Cette hydrolyse n'est pas nécessaire à la polymérisation du MT mais est essentielle pour déstabiliser la paroi du MT et induire sa dépolymérisation (Carlier et Pantaloni, 1981 ; O'brien et al., 1986 ; Hyman et al., 1992 ; Caplow et al., 1994). Il a également été montré récemment *in vitro* que la tubuline-GDP pouvait s'incorporer au MT et en modifier les propriétés (Valiron et al., 2010).



Les deux extrémités polymérisent différemment, l'extrémité (+) polymérisant approximativement deux fois plus vite que l'extrémité (-). *In vivo*, le pôle (-) du microtubule est stabilisé par liaison au centre de nucléation.

c L'instabilité dynamique des MTs

La réorganisation rapide des différents réseaux au sein de la cellule pour permettre une réponse rapide à ses différents besoins met en évidence une capacité des microtubules à polymériser et dépolymériser au cours du temps.

L'instabilité dynamique fut pour la première fois décrite par Mitchison et Kirschner en 1984, qui ont montré *in vitro* par microscopie électronique la coexistence de deux populations de microtubules, une dans laquelle les MTs polymérisent lentement et une autre où les MTs dépolymérisent rapidement. Ils proposent alors un modèle dans lequel les microtubules alternent entre phase de polymérisation et dépolymérisation. Ce phénomène d'instabilité dynamique a par la suite été observé de façon directe par vidéo-microscopie optique par Horio et Hotani (1986), où les auteurs montrent que les MTs présentent des phases d'elongation et de raccourcissement aléatoires au sein d'un même MT, et que le comportement des extrémités (+) et (-) est indépendant l'un de l'autre. La dépolymérisation surviendrait à cause de la déstabilisation des interactions latérales entre les protofilaments entraînant une ouverture, la catastrophe et donc la dépolymérisation rapide du microtubule en forme de peau de banane (Mandelkow et al., 1991) (Figure 8). L'instabilité dynamique est un phénomène intrinsèque à la composition du MT. La transition entre une phase de polymérisation et de dépolymérisation est appelée une catastrophe, tandis que le phénomène inverse est appelé un sauvetage. Elle est définie par quatre critères, qui sont la vitesse de polymérisation et de dépolymérisation, les fréquences de catastrophes et de sauvetages. Le mécanisme exact expliquant l'instabilité dynamique est encore mal connu. Deux modèles ont été proposés pour l'expliquer. Dans certaines conditions, il a été montré que la tubuline β présentait un délai avant l'hydrolyse de son GTP après son insertion dans le microtubule, résultant en la formation d'une coiffe de tubuline-GTP à l'extrémité du MT (Carlier et Pantaloni, 1981). Mitchison et Kirschner ont alors proposé en 1984 que les catastrophes seraient provoquées par la perte de cette coiffe (Figure 9). Supportant ce modèle, il a été démontré que l'hydrolyse du GTP n'était pas nécessaire à la polymérisation, mais que celle-ci est essentielle pour déstabiliser sa paroi et induire la dépolymérisation (Hyman et al., 1992, Hyman et al, 1995). En effet, la tubuline sous sa forme GDP présente une conformation courbe (Melki et al, 1989), qui serait induite par l'hydrolyse du GTP. Ceci aurait pour conséquences d'induire une courbure des protofilaments vers l'extérieur du MT induisant par le même fait une déstabilisation des interactions latérales entre les protofilaments (Figure 10).

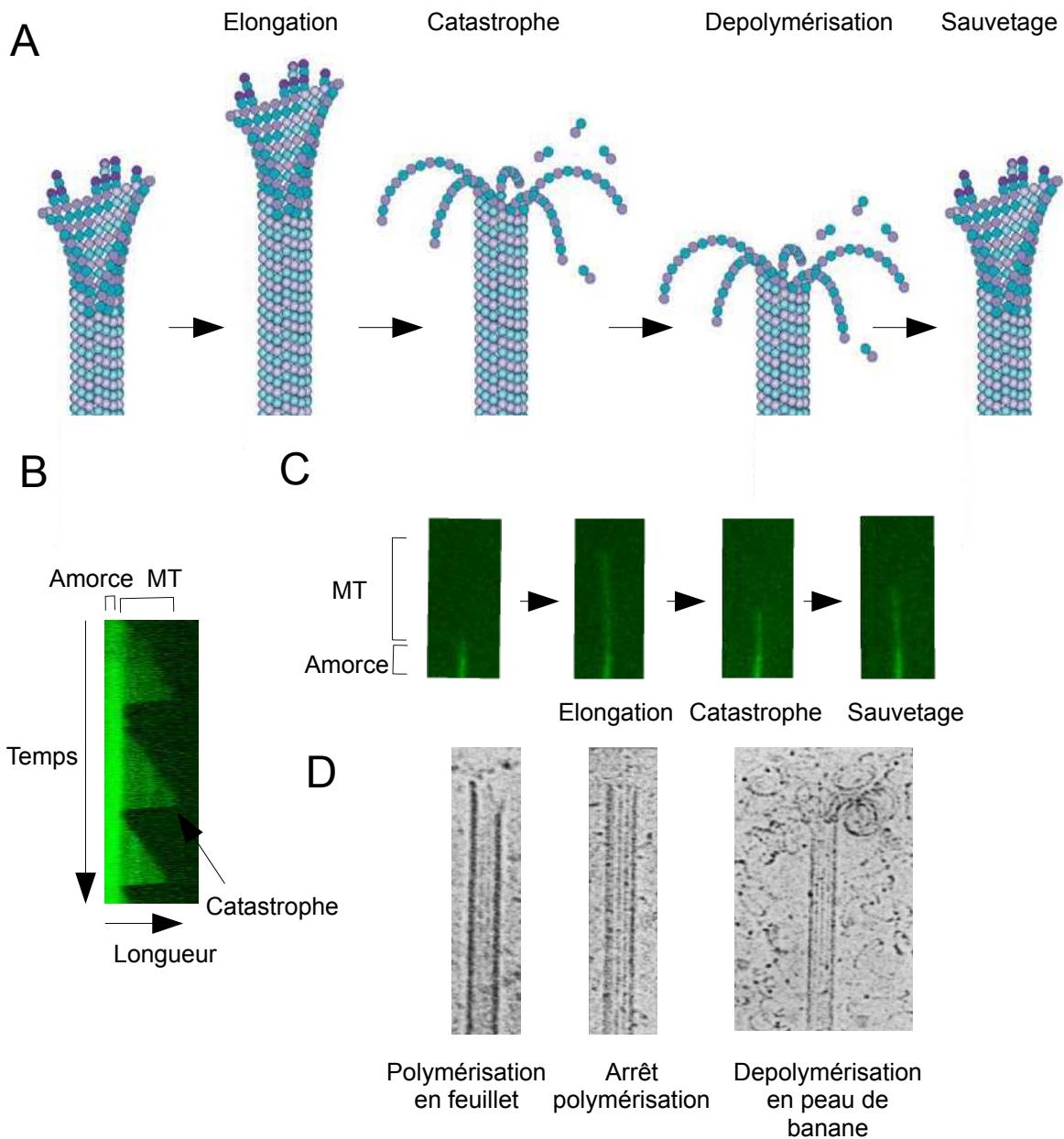


Figure 8 Instabilité dynamique des MTs.

A: Schéma représentant les différentes phases de la dynamique du MT. Le MT polymérite à son extrémité et peut entrer de façon aléatoire dans une phase de dépolymérisation (catastrophe). Dans ce cas le MT raccourcit, les protofilaments se dissociant de la lattice du MT en se courbant. La depolymérisation peut être stoppée et le MT peut alors de nouveau entrer dans une phase d'elongation (sauvetage). B : Kymographe représentant l'historique de la vie du MT (phase de polymérisation et depolymérisation). C : Séquence d'images en vidéo microscopie TIRF montrant l'instabilité dynamique du MT (l'amorce servant de nucléateur pour le MT est stabilisée avec du GMPCPP et est représentée en vert foncé. L'elongation du microtubule est suivie en vert clair). D: Image de microscopie électronique représentant de gauche à droite l'elongation du microtubule avec la présence d'un feuillett. Au centre, le microtubule avec une extrémité franche et correspondant à une phase stationnaire du MT. Enfin à droite le microtubule en phase de dépolymérisation avec la dissociation des protofilaments courbe de la lattice donnant une impression de dépolymérisation en « peau de banane ». Adaptée de Mandelkow et al, 1991.

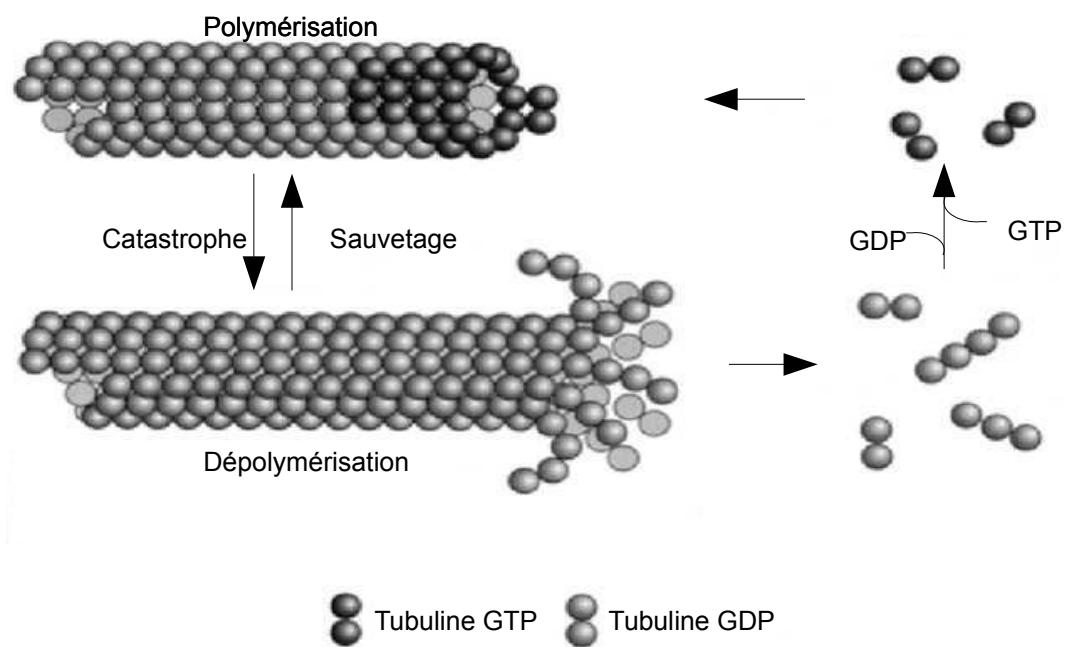


Figure 9: Représentation schématique de la coiffe-GTP. La présence de tubuline-GTP à l'extrémité permet la stabilisation du microtubule en croissance. Lorsque cette coiffe est perdue suite à l'hydrolyse du GTP en GDP, le microtubule perd sa stabilité et dépolymérise.

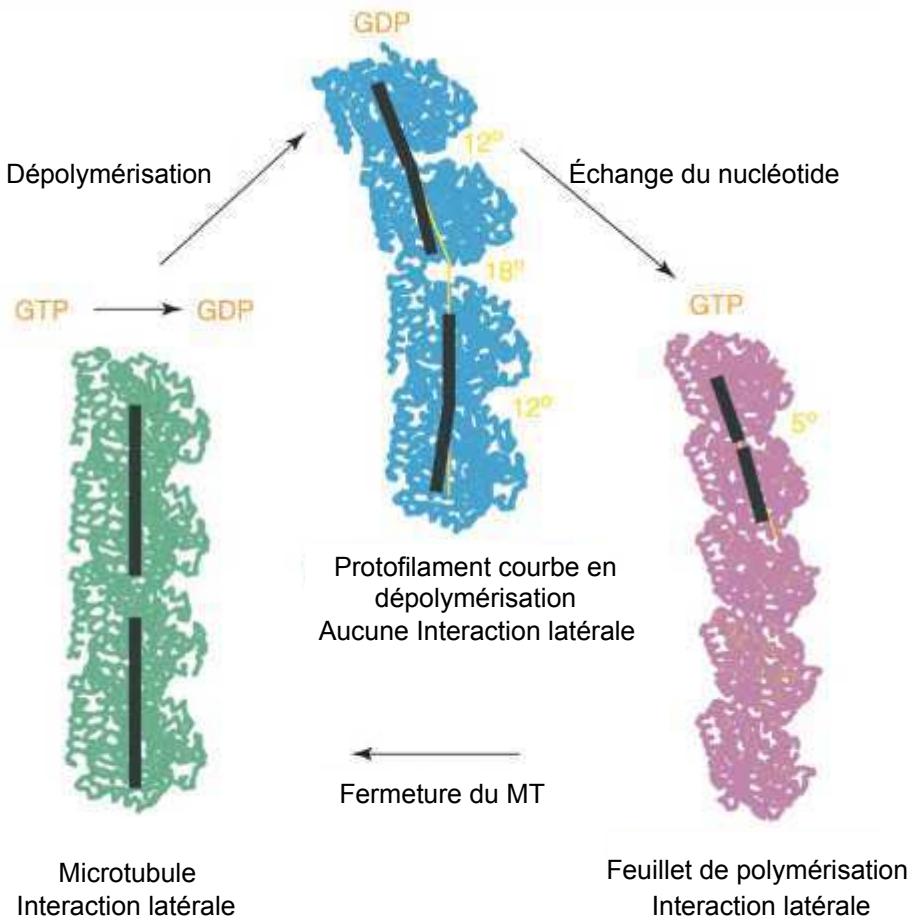


Figure 10: Modèle de l'état des protofilaments lors de la polymérisation et dépolymérisation des microtubules.

L'hydrolyse et l'échange du nucléotide sur la tubuline va induire des modifications conformationnelles des protofilaments au sein du MT. Ainsi les protofilaments dont le nucléotide GTP a été hydrolysé en GDP présentent des courbures interne au sein même du dimère de tubuline avec un angle de 12° mais également une courbure inter-dimère de 18° (microtubule en bleu). Ceci à pour conséquence de rendre le protofilament courbe et ainsi diminuer les interactions latérales facilitant la survenue de catastrophe et la dépolymérisation du microtubule. Le protofilament GTP au niveau du feuillet présente quand à lui une courbure moins importante avec un angle de 5° favorisant la fermeture du MT et pouvant expliquer entre autre un possible phénomène de sauvetage lors de la dépolymérisation en échangeant son nucléotide de façon à refermer la structure. (Adaptée de Nogales et Warg 2008)

Le second modèle, celui de la coiffe conformationnelle, prend en compte les forces à l'intérieur du MT pour expliquer la dynamique des MTs (Chretien et al., 1995 ; Jánosi et al., 1998 ; Chretien et al., 1999). Selon ce modèle, la courbure intrinsèque des protofilaments vers l'extérieur du MT est compensée par les forces latérales entre les profilaments ayant pour

conséquence leur redressement et la fermeture du MT. Ceci a pour conséquence l'accumulation d'énergie au sein de la paroi du MT du à la courbure des protofilaments. L'existence du feuillet à l'extrémité du MT permet ainsi aux protofilaments d'adopter leur configuration native courbe dans un état stable et formerait ainsi une coiffe conformationnelle stabilisant le MT. La perte de cette coiffe serait responsable de l'apparition des catastrophes. En accord avec ce modèle, un autre mécanisme a été proposé pour expliquer la survenue des catastrophes associant la longueur du feuillet, l'énergie accumulée dans la paroi du MT et la survenu de défaut lors de la polymérisation (Chretien et Fuller, 2000 ; Hunyadi et al., 2005). Lorsque le feuillet est suffisamment grand, celui-ci est capable de se refermer en incorporant les défauts le long de la paroi du MT (comme par exemple un nombre de protofilaments anormal, l'incorporation de trou dans la paroi du microtubule ou une fermeture anormale de la lattice). Cependant, quand le feuillet est trop court, il serait incapable de se refermer sur un défaut, entraînant la perte de stabilité de la coiffe conformationnelle et la dépolymérisation du MT (Figure 11).

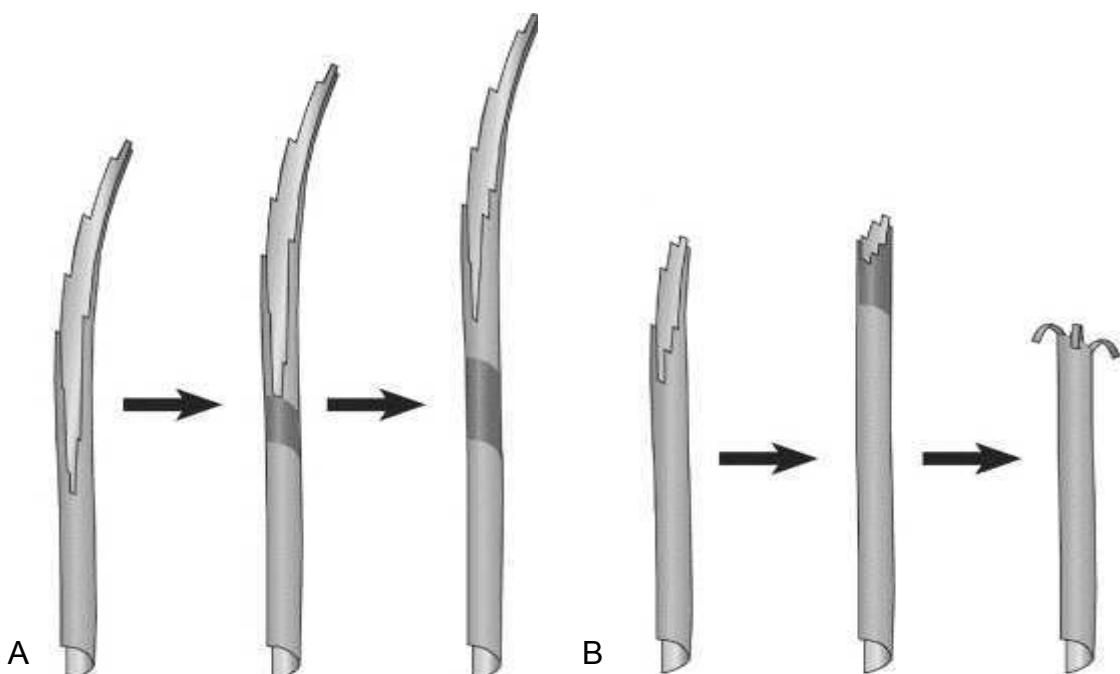


Figure 11 : Représentation schématique de la coiffe conformationnelle.

A : Dans le premier cas, le feuillet du microtubule est suffisamment grand pour se refermer tout en incorporant dans la paroi du microtubule des défauts lors de l'elongation (représenté par les zones grises foncées). B : Dans le second cas, le feuillet n'est pas suffisamment long pour former une coiffe conformationnelle. Dans ce cas, le microtubule se referme alors sur la zone de défauts, présentant ainsi une configuration instable et induisant la dépolymérisation du microtubule. (Adaptée de Hunyadi et al., 2005)

L'existence de l'instabilité dynamique *in vivo* fut rapidement confirmé après sa découverte *in vitro* par vidéo-microscopie DIC (Differential Interference Contrast) (Cassimeris et al., 1988 ; Hayden et al., 1990). Celle-ci va ainsi jouer un rôle important dans de nombreux phénomènes physiologiques, notamment le mécanisme de « recherche et capture », décrivant l'exploration rapide d'un volume afin de trouver une cible. L'exemple le plus frappant étant l'ancre des MTs aux kinétochores et de la ségrégation des chromosomes lors de la mitose cellulaire (Mitchison et Kirschner 1985 a et b). De façon générale, l'instabilité dynamique permet une réorganisation rapide du réseau microtubulaire pour induire une réponse adaptée aux besoins de la cellule. Cependant, l'ensemble de ces mécanismes se doit d'être finement régulés pour permettre ces différentes réponses, or l'instabilité dynamique est un phénomène aléatoire au sein du MT.

II La régulation de la dynamique des MTs

Il a été montré après purification de tubuline l'existence de différents types de protéines toujours associées avec les MTs et capables de réguler leur propriété dynamique et leur organisation qui sont les MAPs (Sloboda et al., 1976 ; Olmsted, 1986). On distingue ainsi les protéines régulatrices des MT qui influent sur les propriétés d'assemblage et l'instabilité dynamique, les protéines capables d'interagir avec les extrémités (+) et (-), respectivement les + et - TIPs ou encore les facteurs déstabilisant qui favorise le désassemblage des MTs.

1 les MAPs stabilisatrices classiques

Les premières MAPs étudiées furent les MAPs neuronales, qui de façon générale stabilisent les microtubules et interagissent avec les dimères de tubuline le long de la paroi du MT ce qui permettrait d'augmenter la force des interactions latérales et/ou longitudinales au sein du MT et le stabiliser (Cassimeris et Spittle, 2001).

a MAP de type 1 : MAPI

La protéine MAPI compte, chez la plupart des vertébrés, trois isoformes différentes non repliées MAPI A, MAPI B, et MAPI S chacune exprimées à partir de gènes différents (Fink et al., 1996 ; Orban-Németh et al., 2005).

Chaque isoforme est transcrive en un précurseur sous forme d'un polypeptide de grande taille qui est par la suite clivé près de son extrémité C-terminale en une chaîne lourde (HC : Heavy chain) et une chaîne légère (LC : Light chain) : MAP1A-HC de 350 kDa, MAP1B-HC de 300 kDa et MAP1S de 100 kDa et les chaînes légères LC2 de 28 kDa à partir de MAP1A, LC2 de 32 kDa à partir de MAP1B et la chaîne légère MAP1S-LC de 25 kDa (Hammarback et al., 1991 ; Langkopf et al., 1992 ; Orban-Németh et al., 2005) (figure 12).

In vitro, les protéines MAP1A et MAP1B sont toutes deux capables d'interagir avec les microtubules via des domaines de liaison situés sur la chaîne lourde au niveau de la partie N-terminal de la protéine (Noble et al., 1989 ; Zauner et al., 1992 ; Cravchik et al., 1994 ; Vaillant et al., 1998 ; Tögel et al., 1998). Les chaînes lourdes ont été montrées comme étant capables d'interagir tout le long de la paroi du microtubule. Elles permettent de promouvoir l'assemblage de la tubuline et de lier et stabiliser les MTs (Kuznetsov et al., 1981 ; Vandecandelaere et al., 1996 ; Bondallaz et al., 2006). Par ailleurs, les protéines MAP1A et MAP1B sont également capables d'interagir avec les MTs via un site de liaison localisé sur la chaîne légère des protéines. En effet, la chaîne légère de la protéine MAP1B est capable de lier les microtubules permettant ainsi de stabiliser les microtubules (ils deviennent plus

résistants à l'effet dépolymérisant du nocodazole) (Tögel et al., 1998). Tout comme la chaîne légère de MAP1B, la chaîne légère de MAP1A a par la suite également été montrée comme pouvant lier les microtubules et les stabiliser à des agents dépolymérisation comme la colchicine (Noiges et al., 2002). Les mêmes auteurs ont par la suite montré que les chaînes légères de MAP1A et MAP1B avaient un effet sur la dynamique du MT *in vitro*. Celles-ci permettent d'augmenter la vitesse de polymérisation des microtubules et les stabilisent en réduisant l'apparition de phénomène de catastrophes. La protéine MAP1S diffère des deux précédentes : uniquement sa chaîne légère est capable d'intéragir avec les MTs, la chaîne lourde ne contenant pas de domaine de liaison aux microtubules, pour permettre la stabilisation des MTs en les rendant résistants aux agents dépolymérisants, comme le nocodazole (Orban-Németh et al., 2005) (figure 12).

En plus de leur capacité à lier les microtubules, les chaînes légères des protéines MAP1A, MAP1B et MAP1S sont aussi capable de lier les filaments d'actine (Tigel et al., 1998 ; Noiges et al., 2002), et pourrait donc jouer un rôle sur leur stabilité (Dehmelt et Halpain, 2004), cependant on ignore si les protéines MAP1 sont capable de lier à la fois les MTs et l'actine et de faire le lien entre les deux .

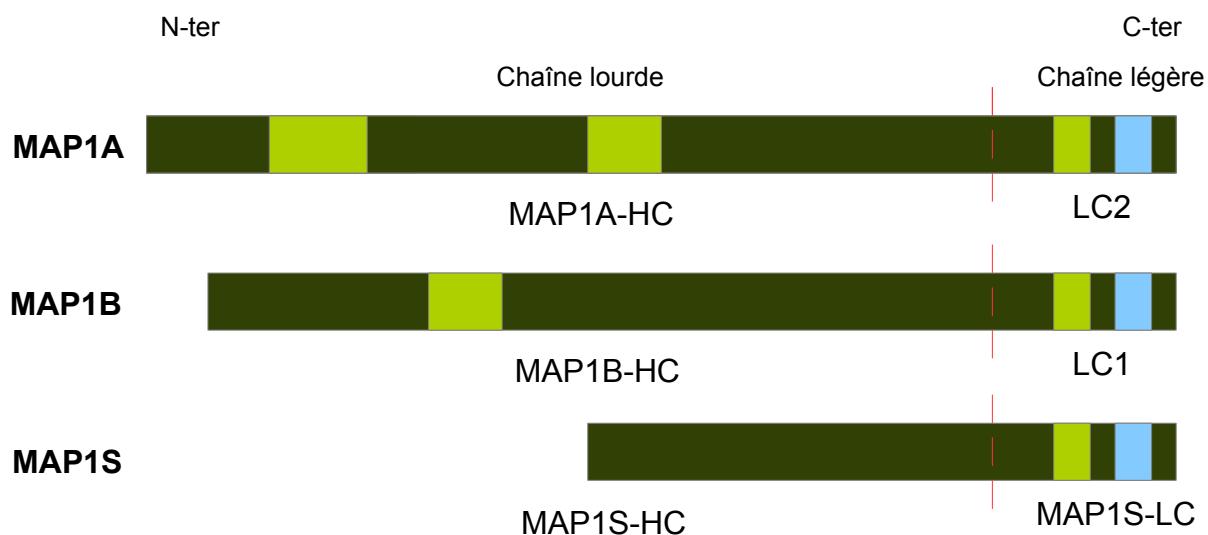


Figure 12 : Représentation des différentes protéines MAP1.

Il existe trois isoformes différentes de la protéine MAP1 : MAP1A, MAP1B, et MAP1S toutes trois clivées en une chaîne lourde (HC) et une chaîne légère (LC). Elles sont capable de lier les MTs et l'actine. ■ : domaine de liaison au MT ; □ : domaine de liaison à l'actine ; — — — : site de clivage.

L'expression des protéines MAP1 est très régulée. La protéine MAP1B est principalement exprimée au cours du développement et son expression diminue au cours du temps . On la retrouve majoritairement au niveau des axones en croissance (Tucker et Matus, 1987) et son effet sur les MTs est régulé par phosphorylation (Chang et al., 2003 ; Trivedi et al., 2005). De plus, la phosphorylation de MAP1B permettrait une réponse plus efficace des MTs aux agents depolymérisants et jouerait ainsi un rôle important dans la croissance axonale en influençant la dynamique des microtubules. Dans des cultures de neurones primaires, l'inhibition de la protéine MAP1B par des ARNs antisens témoigne d'un rôle de la protéine sur la morphogénèse neuronale, l'inhibition entraînant une baisse de la croissance neuritique et de l'elongation axonale (Brugg et al., 1993). Ces résultats ont été confirmés *in vivo* par la génération de souris KO pour la protéine MAP1B présentant des défauts du comportement et de développement neuronal comme l'absence de corps calleux, région du cerveau riche en axones (Edelmann et al., 1996 ; Gonzales et al., 2000 ; Bouquet et al., 2004). Ainsi MAP1B apparaît être un régulateur clé des fonctions neuronales mais ces mécanismes d'action restent à être précisés.

La protéine MAP1A, exprimée chez l'adulte, est fortement représentée au niveau des dendrites et joue un rôle important dans la synaptogénèse (Schoenfeld et al., 1989 ; Szebenyi et al., 2005). MAP1S est quant à elle exprimée de façon ubiquitaire (Orban-Nemeth et al., 2005). De façon intéressante le KO de la protéine MAP1 n'entraîne cependant pas de déficits neurodevelopmentaux mais entraîne des troubles de plasticité synaptique (Takei et al., 2015). Le rôle exact de MAP1B dans ces mécanismes reste à être élucidé, notamment la contribution de la stabilisation des MTs dans ces mécanismes de plasticité.

b MAP de type 2 : MAP2

Différentes formes de la protéine MAPII ont été décrites, deux de haut poids moléculaires (d'environ 280 kDa) et deux de faibles poids moléculaires (65 et 70 kDa), respectivement les protéines MAPIIa-MAPIIb et MAPIIc-MAPIId (Figure 13). Les isoformes de la protéine MAPII sont obtenues par deux ARNms distincts transcrits à partir d'un même gène (Lewis et al., 1986; Neve et al., 1986).



Figure 13: Représentation des différentes protéines MAP2.

On distingue deux isoformes de haut poids moléculaire, MAPII A et MAPII B réspecivement 280 et 270 kDa, et deux isoformes de faible poids moléculaire, MAPII C et MAPII D, réspectivement 65 et 70 kDa. ■ : domaine de liaison au MT.

La protéine MAPII est nativement non repliée et adopte une conformation spécifique quand celle-ci interagit avec sa cible (revue Uversky 2002). Elle est principalement exprimée dans les neurones et plus précisément dans le corps cellulaire et les dendrites, suggérant un rôle de MAPII dans la polymérisation des MTs dans les dendrites (Huber et Matus 1984 ; Caceres et al., 1984). Cependant cette protéine peut également être trouvée dans d'autres cellules non-neuronales comme les oligodendrocytes, les astrocytes ou encore dans les testicules (Tucker et Matus 1987 ; Vouyiouklis et al., 1995 ; Loveland et al., 1999). L'isoforme MAPIIc est exprimée durant les stades précoces du développement neuronal et sera progressivement remplacée par l'isoforme MAPIIa dans les neurones matures. La protéine MAPIIb est quant-à-elle exprimée à la fois pendant les phases de développements et à l'âge adulte (Chung et al., 1996).

La protéine MAPII interagit avec les MTs via des domaines d'interactions dans la partie C-terminale de la protéine et favorise ainsi la nucléation, augmente la vitesse de polymérisation et stabilise les MTs (Kowalski et Williams, 1993 ; Hirokawa, 1994 ; Gamblin

et al., 1996). Elle est également capable de promouvoir la formation de faisceaux de MT et plus particulièrement les isoformes MAPIIa et MAPIIc (Chen et al., 1992 ; Weisshaar et al., 1992 ; Ferhat et al., 1996). Son interaction est dépendante de son état de phosphorylation, permettant ainsi une régulation de son interaction et de sa localisation dans la cellule, la protéine MAPII hyperphosphorylée ou déphosphorylée étant incapable de lier les MTs (Brugg et Matus 1991 ; Ozer et Halpain, 2000 ; Chang et al., 2003).

In vitro, il a été montré que la protéine MAPII promeut l'assemblage des MTs en favorisant leur nucléation. Il a également été trouvé au niveau de microtubule individuel que la protéine MAPII permettait la stabilisation des microtubules. La protéine MAPII augmente la vitesse de polymérisation et réduit la vitesse de dissociation des microtubules lors de la dépolymérisation. Elle permet également une réduction du phénomène de transition entre la phase de polymérisation et dépolymérisation (Pryer et al., 1992 ; Kowalsky et Williams, 1993).

De façon intéressante, il a également été montré *in vitro* que la protéine MAPII était capable de lier les filaments d'actine en faisant intervenir les mêmes domaines de liaisons aux microtubules, en particulier l'isoforme MAPIIc, suggérant un rôle de la protéine dans le développement des neurites (Dehmelt et al., 2003 ; Roger et al., 2004). La production d'un peptide synthétique comportant un des domaines répétés (liant les microtubules) de MAPII se lie à l'actine (Coreas et al., 1990). L'association de la protéine MAPII avec l'actine semblerait être favorisée lorsque les domaines répétés responsable de l'intéraction sont sous forme phosphorylés sur un site présent dans chacune des répétitions (Ozer et Halpain, 2000).

In vivo, l'inhibition de l'expression de MAPII dans des neurones primaires entraîne une diminution du nombre de neurites ainsi que la désorganisation du réseau microtubulaire neuritique et du nombre de MTs dans les neurites (Sharma et al., 1994). De façon similaire l'inhibition de la protéine MAPII dans des neurones corticaux empêche la croissance axonale laissant supposer un rôle de MAPII. Cependant, la protéine MAPII ne semble pas essentielle, les souris invalidées pour la protéine ne présentant pas de défaut d'organisation neuronal laissant suggérer que les fonctions de MAP2 pourraient être plus subtiles que la stabilisation des microtubules, la double invalidation des protéines MAP2 et MAP1B induit des phénotypes bien plus sévères que ceux observés dans l'invalidation simple de l'une ou l'autre protéine (Teng et al., 2001) bien que l'on n'observe toujours pas de défauts majeurs d'elongation axonale.

c La protéine Tau

La protéine Tau existe sous un grand nombre d'isoformes, générées par l'épissage alternatif d'un seul gène. Elle se subdivise en trois parties : le domaine de projection N-terminal de longueur variable du à l'insertion de la répétition de 29 ou 58 acides aminés selon les isoformes (nommée N) appelée ainsi car elle n'est pas associée au MT et constituerait un domaine de projection orienté vers l'extérieur du MT (Hirokawa et al., 1988); une partie centrale riche en résidu proline impliquée dans la liaison au MT (Kanai et al., 1992 ; Lee et Rook, 1992 ; Gustke et al., 1994) ; et la région C-terminale, responsable de l'interaction des protéines Tau avec les MTs, avec trois ou quatre répétitions de 31 ou 32 acides amines (nommée R) (Lee et al., 1988 ; Goedert et al., 1989). On distingue ainsi six isoformes en fonction du nombre de répétitions dans la partie N et C-terminale : La Tau 2N4R, 1N4R, 0N4R, 2N3R, 1N3R et 0N3R avec un poids moléculaire qui varie de 36,7 kDa à 45,8 kDa (Goedert et Jakes, 1990) (figure 14).

Les différentes isoformes ont une expression variable au cours du développement. L'isoforme 0N3R s'exprime tôt au cours du développement embryonnaire et va progressivement être remplacées par les autres isoformes à l'âge adulte (Kosik et al., 1989) où elles se situent principalement au niveau de l'axone. Les protéines Tau sont des MAP neuronales qui furent initialement identifiées comme étant capable de promouvoir la nucléation des MTs *in vitro* (Weingarten et al., 1975 ; Cleveland et al., 1977). Elles sont également capable de former des faisceaux de MTs et ont été montrées comme étant capable de lier la partie externe, et éventuellement également la région interne des MTs (Lewis et al., 1989 ; Scott et al., 1992 ; Kanai et al., 1992 ; Kar et al., 2003 ; Santarella et al., 2004). Pour mieux comprendre comment la protéine tau module le réarrangement spatial des MTs pendant la formation de l'axone, des études ont été réalisées afin de comprendre les effets de la protéine Tau sur la dynamique des MTs par vidéo microscopie. Il a ainsi été montré que la protéine Tau permettait la stabilisation des MTs *in vitro*. Elle augmente la vitesse de polymérisation des MTs et diminue la fréquence de catastrophe. En accord avec cet effet stabilisateur, elle est également capable de diminuer la vitesse de dépolymérisation des MTs et permet également l'apparition d'événements de sauvetage (Drechsel et al., 1992 ; Barlow et al., 1994, Trinczek et al., 1995).

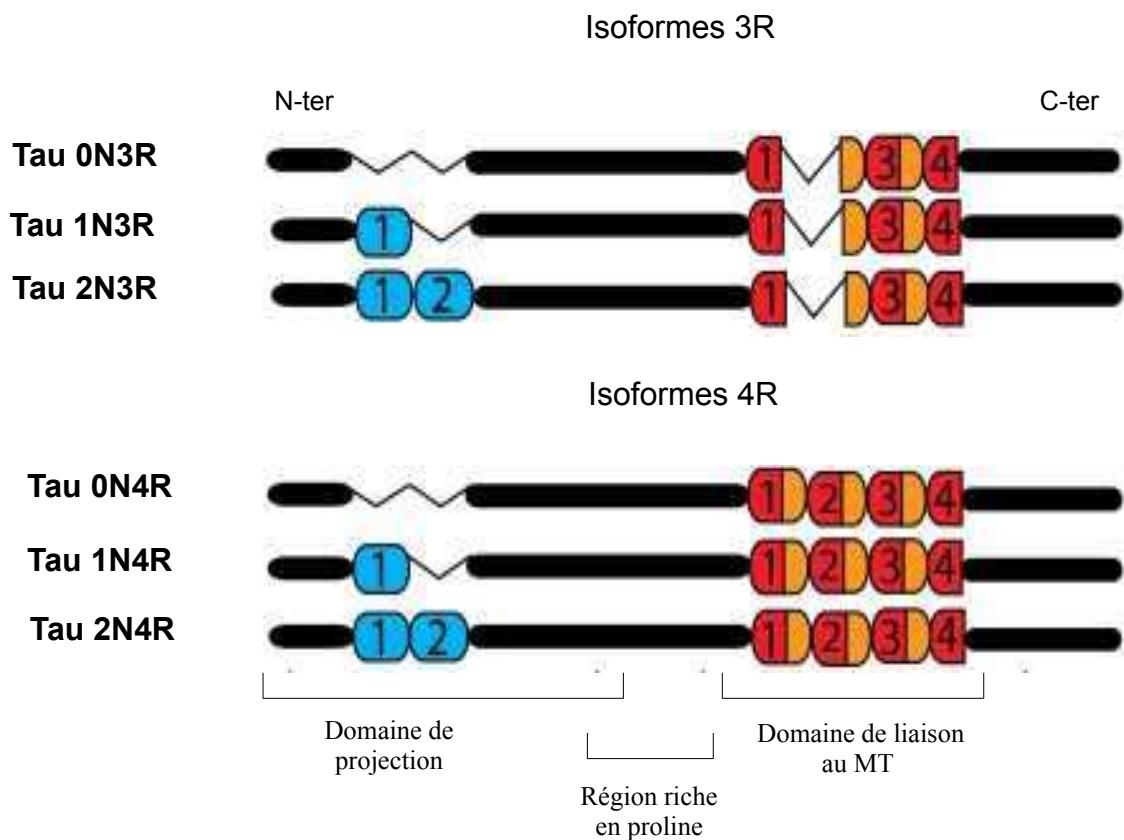


Figure 14: Représentation schématique des six isoformes de la protéine Tau.

Les six isoformes, générées à partir de l'épissage alternatif d'un seul ARNm, diffèrent par la présence de 3 ou 4 répétitions C-terminal de 18 acides aminés (en rouge) séparées les unes des autres par 13 ou 14 acides aminés (en orange) constituant le domaine de liaison au MT, et par la présence en N-terminal de zero, une ou 2 répétitions de 29 acides aminées (en bleu) (adaptée de Rosenberg et al., 2008).

Ces différentes propriétés permettent aux protéines tau d'induire le développement de longs prolongements dont l'organisation microtubulaire est semblable à celle observée dans un axone. Elle jouerait ainsi un rôle majeur dans la maturation neuronale (Binder et al., 1985 ; Baas et al., 1991 ; Knops et al., 1991 ; Chen et al., 1992). Les protéines Tau sont phosphorylables principalement au niveau de la région riche en proline et au niveau de leurs domaines de liaison aux MTs (Cho et Johnson, 2003). Leur phosphorylation va permettre une régulation de la protéine en inhibant leur association avec les MTs et va ainsi permettre une régulation de l'effet de la protéine Tau sur la dynamique des MTs (Lindwall et Cole, 1984 ; Dreschel et al., 1992 ; Kanai et al., 1992). On distinguera particulièrement la phosphorylation des Ser262 et Ser356 qui pourraient diminuer très fortement (Seubert et al., 1995) voire même empêcher la liaison de tau aux microtubules en modifiant la structure de la protéine (Biernat et al., 1993; Drewes et al., 1995; Trinczek et al., 1995 ; Jho et al., 2010 ; Fischer et al., 2009).

La Ser262 semble de plus grand intérêt puisque elle a été effectivement trouvée phosphorylée sur les protéines tau *in vivo* (Morishina-Kawashima et al., 1995). La phosphorylation de la Thr231 semble intervenir dans la régulation de l'activité de nucléation des protéines tau (Wang et al., 1996). Dans des cas pathologiques comme dans la maladie d' Alzheimer, on retrouve la protéine Tau hyper-phosphorylée sous forme d'agrégats entraînant une déformation des neurites (Grundke-Iqbali et al., 1986 ; Stoothoff et Johnson, 2005).

Enfin, les protéines Tau sont également capables de lier l'actine, bien que cette interaction fut longtemps controversée. Jusqu'à récemment, il a été proposé que la protéine Tau n'interagissait pas avec les filaments d'actine (Roger et al., 2004). Il a cependant été montré par la suite que la protéine était capable d'interagir avec l'actine chez la drosophile (Fulga et al., 2006) et de façon directe *in vitro* (He et al., 2009 ; Elie et al., 2015). De plus la protéine tau a été montré comme étant capable de lier à la fois les MTs et l'actine *in vitro* en faisant intervenir les mêmes domaines de liaison aux MTs (Elie et al., 2015).

In vivo, la présence des protéines tau ne semble pas indispensable lors de l'axogénèse. L'inhibition de l'expression des protéines Tau par des oligonucléotides anti-sens entraîne un ralentissement de la croissance axonale. Leur absence chez des souris pourrait être compensée par l'action d'autres MAPs, comme MAP1B, les doubles déficientes présentant des défauts sévères (Caceres et Kosik, 1990 ; Harada et al., 1994 ; Takei et al., 2000). Les protéines tau ont également un rôle dans l'établissement de la polarité neuritique de neurones cérébelleux en culture primaire (Caceres and Kosik, 1990; Caceres et al., 1991).

d) La protéine Doublecortine (DCX)

La protéine Doublecortine est responsable quand elle est mutée de lissencéphalie, se caractérisant par une absence de formation de sillon au niveau du cortex, donnant l'impression de deux cortex lisses identiques (des Portes et al., 1998 ; Gleeson et al., 1998 ; Pilz et al., 1998).

La protéine DCX est exprimée pendant le développement embryonnaire et se retrouve enrichie à l'extrémité des neurites en migration et dans la région du cône de croissance des neurones en différentiation (Gleeson et al., 1999).

La protéine contient deux motifs répétés de 90 acides aminés dans sa partie N-terminale permettant sa liaison aux MTs (Taylor et al., 2000). Elle stimule la formation de faisceaux de MTs *in vivo* et *in vitro* (Gleeson et al., 1999), favorise l'autoassemblage et la polymérisation des MTs et permet également leur stabilisation (Horesh et al., 1999 ; Moores et al., 2004). Chez l'homme, la plupart des mutations se situent au niveau du domaine de liaison aux MTs

(Taylor et al., 2000) et induisent des défauts de migration des neurones corticaux (des Portes et al., 1998).

Contrairement aux MAPs précédente, il a été montré *in vitro* que la protéine doublecortine ne modifie pas la vitesse de polymérisation des microtubules. Cependant elle réduit fortement la fréquence de catastrophe et dans le cas où des catastrophes surviennent, la vitesse de dépolymérisation est réduite facilitant les phénomènes de sauvetages (Moores et al., 2006). Pour expliquer cette stabilisation, il a été proposé que la protéine DCX interagissait avec la paroi du MT et s'opposerait à la contrainte induite par la courbure de la tubuline-GDP. En accord avec cette hypothèse, il a été possible *in vitro* de polymériser des microtubules en présence de DCX uniquement avec de la tubuline-GDP (Moores et al., 2006).

L'affinité de la protéine pour les microtubules est régulée comme pour les autres MAPs par phosphorylation (Schaar et al., 2004), JNK (Gdalyahu et al., 2004), PKA ou MARK (Schaar et al., 2004) et inhibe sa capacité de stabilisation des MTs. La phosphorylation de la sérine 297 entraîne une diminution de l'affinité de la doublecortine pour les MTs (Tanaka et al., 2004).

De façon intéressante, il a aussi été montré *in vitro* que la protéine DCX est capable de lier et de former des faisceaux d'actine via la spinophiline. La phosphorylation de DCX permet son interaction avec la spinophiline et une interaction entre les réseaux d'actines et de MTs (Tsukada et al., 2003 ; Bielas et al., 2007), et joue un rôle important dans la formation des lamellipodes et des filopodes dans le cône de croissance des neurones en développement (Fu et al., 2013).

e La protéine MAP6 aussi appelée STOP (Stable tubule only peptide)

Les MTs, entre autre d'avoir la capacité de résister à des conditions dépolymérisantes comme l'exposition à certaines drogues (comme le nocodazole) grâce aux MAPs classiques, sont également capables de résister à la dépolymérisation induites par une exposition au froid. La recherche de facteurs capables de protéger les MTs au froid a permis de déterminer une nouvelle famille de MAPs : la famille des protéines MAP6/STOP (voir paragraphe III).

2. Les facteurs de déstabilisation des microtubules

Au contraire des MAPs stabilisatrices des MTs, afin de permettre la réorganisation et l'adaptation du réseau microtubulaire dans la cellule, des mécanismes de déstabilisation des MTs qui vont favoriser le phénomène de catastrophe sont nécessaires. A l'instar des protéines stabilisatrices, ces protéines vont diminuer la vitesse de polymérisation des MTs et vont stimuler les catastrophes et/ou diminuer la fréquence de sauvetages des MTs en décroissance.

Parmis ces facteurs de déstabilisation sont trouvés les protéines Katanine, OP18/Stathmine ou encore XKCM1 (Xenopus Kinesin Catastrophe Modulator-1).

La protéine OP18/Stathmine est une protéine de 17 kDa qui fut trouvée surexprimée dans différents types de tumeurs. *In vitro*, elle déstabilise les microtubules en séquestrant les dimères de tubuline libre forçant la dépolymérisation des MTs. La protéine favoriserait également la dépolymérisation des MTs en interagissant avec l'extrémité de ce dernier pour stimuler les catastrophes en facilitant l'hydrolyse du GTP en GDP de la coiffe de tubuline GTP (Belmont et Mitchison 1996 ; Howell et al., 1999 ; Andersen 2000 ; revue Cassimeris 2002).

Les katanines sont des protéines dimériques capables de s'autoassembler pour former un hexadimère qui, en présence d'ATP, est capable de briser les liaisons entre les sous-unités α et β de la tubuline et est ainsi capable de découper en « rondelle » les MTs (Quarmby, 2000). Une autre protéine avec un mode de fonctionnement similaire est la protéine Spastine qui se présente également sous forme d'un héxadimère pour permettre de fractionner les MTs. La Spastine fixerait l'extrémité C-Terminale de la tubuline présente à l'extérieur du microtubule et par traction induirait la rupture entre les monomères de tubuline entraînant la perte de structure de la paroi du MT (Roll-Mecak et Vale, 2008).

XKCM1 chez le xénope et son homologue MCAK (Mitotic Centromere Associated Kinesin) chez les mammifères sont des membres de la famille des kinésines-13. Ces protéines utilisent l'énergie de l'hydrolyse de l'ATP pour déstabiliser et induire la dépolymérisation des MTs en augmentant leur fréquence de catastrophes à partir des deux extrémités du MT à la fois *in vivo* et *in vitro* (Lawrence et al., 2004 ; Moore et al., 2005 ; Kinoshita et al., 2006). Ces protéines se fixeraient à l'extrémité du MT en croissance et stabiliseraient la conformation native courbe des protofilaments au niveau du feuillet ayant pour conséquences de favoriser la rupture des interactions latérales entre les protofilaments et donc la dépolymérisation du MT (Ogawa et al., 2004).

De façon à permettre une régulation du réseau microtubulaire, il est donc nécessaire d'avoir une coordination spatiale et temporelle entre les MAPs stabilisatrices et les protéines de déstabilisation des MTs dans la cellule.

3. Les moteurs moléculaires

Les moteurs moléculaires ou MAPs motrices sont ubiquitaires chez les eucaryotes et jouent un rôle essentiel puisqu'ils permettent le transport le long des microtubules de vésicules, de mitochondries, d'ARN, ou encore d'autres protéines comme les +TIPs d'un bout à l'autre de la cellule. Ils vont ainsi avoir un rôle prépondérant, en particulier dans les neurones présentant des elongations cellulaires importantes (avec des structures comme les dendrites ou encore l'axone) et sont par exemple nécessaires au transport des neurotransmetteurs, synthétisés au niveau du corps cellulaire, jusqu'aux terminaisons pré-synaptique. On distingue deux grandes familles de moteurs moléculaires qui sont les kinésines et les dynéines.

a Les kinésines

Il existerait environ 100 kinésines différentes issues de 14 familles. La kinésine-1 fut la première à avoir été identifiée (Vale et al., 1985). Il s'agit d'une protéine tétramérique composée de deux chaînes légères et de deux chaînes lourdes. Les chaînes lourdes sont composées, 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. La région motrice ainsi que le domaine de liaison aux microtubules sont généralement bien conservées entre les différentes kinésines. Ce qui n'est pas le cas de la queue liant le cargo à transporter permettant une spécificité des kinésines vis à vis de l'élément à déplacer. La kinésine-1 est responsable du transport antérograde grâce à un cycle d'hydrolyse de l'ATP en ADP, qui va induire un changement conformationnel qui résulte en une avancée de la protéine sur le microtubule soit de l'extrémité (-) vers l'extrémité (+) du MT (Hirokawa et al., 1989). En plus de leur bien connu rôle de transporteur, certaines kinésines vont en plus être capables d'avoir un effet sur la formation de réseaux de MTs. C'est le cas par exemple de la protéine Eg5 qui est capable d'associer latéralement les microtubules anti-parallèles et ainsi former des faisceaux au niveau du fuseau mitotique. Le déplacement de cette protéine le long des microtubules va ainsi influencer la longueur du fuseau mitotique et permettre leur raccourcissement.

b Les dynéines

Les dynéines à l'instar des kinésines sont elles aussi des complexes multi-protéiques, constitués de deux chaînes lourdes, deux chaînes intermédiaires, quatre chaînes intermédiaires légères ainsi que de plusieurs chaînes légères. Cependant ces dernières vont permettre le déplacement inverse des kinésines des différents éléments de la cellule le long

du MT soit de façon rétrograde, de l'extrémité (+) vers l'extrémité (-) (Vallee et al., 2004). Les chaînes lourdes contiennent le domaine de liaison aux microtubules et d'autres domaines responsables, comme pour les kinésines, de l'échange et de l'hydrolyse de l'ATP en ADP nécessaire au mouvement du moteur moléculaire. Les chaînes intermédiaires ainsi qu'une des chaînes légères participent à l'interaction de la protéine avec les organites à transporter. La dynéine va ainsi jouer un rôle important en permettant dans les neurones de transporter des organelles et des vésicules le long de l'axone, du compartiment pré-synaptique vers le corps cellulaire (Steffen et al 1997 ; Nagano et al 1998 ; Mok et al 2001).

Ainsi, le jeu des différentes kinésines et dynéines va permettre de réguler et moduler le transport de vésicules et de protéines le long des microtubules. *In vitro*, en système reconstitué, il a ainsi été démontré une compétition entre la protéine Tau et la kinésine dans les neurones (Dixit et al 2008). La présence de Tau en trop grande quantité induit le détachement de la kinésine de la paroi du MT. De plus, elle induirait également un changement de direction de la dynéine, laissant également penser que les MAPs pourraient réguler et intervenir dans le transport axonal dépendant des MTs.

4. Les + TIPs

Les + TIPs (« + end tracking protein ») sont des MAPs particulières qui se retrouvent préférentiellement à l'extrémité des MTs en croissance (Schuyler et Pellman, 2001) et vont jouer un rôle important de lien entre l'extrémité du MT et les composants de la cellule. La dénomination de + TIPs n'exclue cependant pas une localisation à l'extrémité – des MTs en croissance.

a *Les protéines du bout (+)*

Parmis les protéines du bout + on retrouve principalement les protéines de la famille des CLIPs (Cytoplasmic Linker Proteins), les CLASPs (CLIP-Associated Proteins) et EBs (End Binding Proteins).

Le premier membre de la famille des +TIPs à avoir été identifié est la protéine CLIP-170 (Cytoplasmic Linker Protein de 170 kDa) (Rickard et Kreis, 1990), et comme étant capable de lier spécifiquement les organelles aux MTs (Pierre et al., 1992). Par la suite, d'autres protéines au comportement similaire ont été découvertes et classées dans la famille des + TIPs (Carvalho et al., 2003 ; Morrison et al., 2007). La famille des CLIPs distingue deux membres principaux chez les mammifères : une protéine ubiquitaire CLIP170, et une isoforme spécifique du cerveau, la protéine CLIP115. Les deux protéines sont caractérisées

par un région N-terminale avec deux domaines riche en résidus glycine permettant la liaison au MT (Hoogenraad et al., 2000 ; Pierre et al., 1992). Elles possèdent également une région centrale responsable de la formation d'homodimère (Scheel et al., 1999). Seul la partie C-terminale diffère entre les deux protéines, la protéine CLIP170 possédant en plus un motif en doigts de zinc permettant de lier les vésicules endocytaires (Pierre et al., 1992). La protéine CLIP170 est capable de lier les MTs et de s'associer en forme de comète aux extrémités positives des MTs (Perez et al., 1999 ; Diamantopoulos et al., 1999). De plus, la localisation de la protéine CLIP170 à l'extrémité du MT lui permet une régulation de la dynamique du MT en facilitant le sauvetage *in vivo* et *in vitro* (Komarova et al., 2002 ; Arnal et al., 2004) et va aussi faciliter la nucléation des MTs (Diamantopoulos et al., 1999). Enfin, en addition de son effet sur la dynamique des MTs, les CLIPs sont impliqués dans la capture des MTs via des complexes dynein-dynactin, IQGAP et d'autres +TIPs (Fukata et al., 2002 ; Goodson et al., 2003). La protéine CLIP115 quant-à-elle se localise préférentiellement au niveau des dendrites et permet le lien entre l'extrémité positive du MT et les corps lamellaires dendritiques et joue un rôle dans la développement du système nerveux (Hoogenraad et al., 2002).

Cependant, le mécanisme de localisation des +TIPs à l'extrémité du MT est encore mal connu. Trois modèles ont été proposés pour expliquer cette localisation. Le premier modèle explique la localisation des +TIPs par un transport actif via un moteur moléculaire se déplaçant vers l'extrémité (+) des MTs. Le deuxième propose un mécanisme d'autostop, qui correspond à l'adressage de la protéine à l'extrémité du MT par l'intermédiaire d'une autre protéine elle aussi adressée au bout (+) des MTs. Le dernier modèle propose un modèle de tapis roulant ou « treadmilling ». Dans ce modèle, l'interaction de la protéine au bout (+) se ferait par reconnaissance d'une structure spécifique comme le feuillet ou par copolymérisation avec la tubuline libre. Par la suite, le MT continuant de polymériser, la protéine se retrouverait au niveau de la paroi du MT et le décrochage pourrait s'expliquer par un changement de son affinité avec la paroi du MT par rapport à l'extrémité (Arnal et al., 2004 ; Folker et al., 2005). Une autre hypothèse serait un décrochement au niveau de la paroi du MT suite à une phosphorylation comme cela a été proposé pour CLIP170 ou bien une différentiation de la tubuline sous sa forme GTP et GDP par la +TIP (Rickard et Kreis, 1991 ; Hoogenraad et al., 2000 ; Folker et al., 2005).

Parmis les autres +TIPs on retrouve la famille des CLASPs, initiallement identifiée comme protéines partenaires des CLIPs, divisée en deux sous-familles, les CLASPs de type 1, ubiquitaire, et les CLASPs de type 2 abondantes dans le cerveau (Akhmanova et al., 2001).

De façon similaire, les protéines CLASPs lient les MTs, leur interaction est régulée par phosphorylation et elles forment des comètes à l'extrémité des MTs. Bien qu'identifiées comme partenaire des CLIPs, les CLASPs sont capables par elles-mêmes de stabiliser les MTs en se liant à leur extrémité où le long de la paroi (Akhmanova et al., 2001). *In vitro*, seule l'analogue cls1p des CLASPs chez *saccharomices pombe* a été étudiée et cette dernière montre une augmentation de la stabilité des MTs en réduisant la fréquence des catastrophe et en augmentant la fréquence de sauvetage. De façon intéressante, comme il a également été dit auparavant, *in vitro* la protéine cls1p ne se localise pas préférentiellement à l'extrémité positive du MT et est visible tout du long de la lattice (Al-Bassam et al., 2010).

Enfin, une autre grande famille des +TIPs protéines est la famille de protéine EB1. La protéine EB1 est une +TIP hautement conservée qui fut initialement décrite comme un partenaire du suppresseur de tumeur APC (Adenomatous Polyposis Coli) (Su et al., 1995 ; Kinzler et Vogelstein, 1996). C'est une protéine clé des complexes des bouts + des MTs en croissance, grâce à son interaction avec la plupart des autres protéines de bouts + (Lansbergen et Akhmanova, 2006).

Tout comme les autres +TIPs, la protéine EB1 joue un rôle essentiel dans la capture des MTs au niveau du front de migration des cellules. Bien que de nombreuses études ont été réalisées sur le rôle de la protéine EB1 sur la dynamique des MTs, son effet précis sur l'instabilité dynamique est encore controversé. Des études ont en effet montré que la protéine EB1 augmentait à la fois la fréquence de catastrophes et de sauvetages (Tirnauer et al., 1999 ; Rogers et al., 2002), tandis que d'autres études ont montré une inhibition de la fréquence de catastrophes et une stabilisation des MTs (Tirnauer et al., 2002 ; Busch et Brunner, 2004). *In vitro*, la protéine EB1 a été montrée comme augmentant la vitesse de polymérisation des microtubules et est capable de promouvoir à la fois la fréquence de catastrophe mais également celle de sauvetage (Ligon et al., 2003 ; Bieling et al., 2007 ; Vitre et al., 2008). L'augmentation de la fréquence de sauvetage étant cependant observé dans des conditions où la protéine EB1 est mise en présence de tubuline libre dans un rapport plus faible, dans ce cas la protéine EB1 se retrouve également au niveau de la lattice du MT, pouvant expliquer l'effet observé. Ces effets stimulants sur la vitesse de polymérisation des MTs et sur la fréquence de catastrophe indiquent que la protéine EB1 présente des activités distinctes à l'extrémité du MT. (L'ensemble de ces +TIPs vont également être capable d'interagir les unes avec les autres de façon à moduler leur activité et répondre aux besoins de la cellule) (Figure 15).

| +TIP* | Homologs† | Interaction with other +TIPs |
|-----------------------|--|---|
| EB1-like proteins | Bim1 (<i>Sc</i>) Mal3 (<i>Sp</i>) | Most known +TIPs |
| CLIP-170 | CLIP-190 (<i>Dm</i>) Bik1 (<i>Sc</i>) Tip1 (<i>Sp</i>) | EB1, CLIP-170, CLIP-115, p150 ^{glued} , CLASP1,2, MCAK, LIS1 |
| CLIP-115 | - | EB1, CLIP-170, CLASP1,2 |
| p150 ^{glued} | NudM (<i>An</i>) Ssm4 (<i>Sp</i>) | EB1, CLIP-170 |
| CLASP1,2 | Orbit/Mast (<i>Dm</i>) Stu1 (<i>Sc</i>) Peg1 (<i>Sp</i>) | EB1, CLIP-170, CLIP-115, ACF7 |
| APC | Kar9p (<i>Sc</i>) | EB1, MCAK |
| ACF7 | Shot/Kakapo (<i>Dm</i>) | EB1, CLASP1,2 |
| STIM1 | - | EB1 |
| MCAK | Klp10A (<i>Dm</i>) XKCM1 (<i>XI</i>) | EB1, CLIP-170, APC, Tip150 |
| Tip150 | - | EB1, MCAK |
| Navigators | - | Unknown |
| Melanophilin | - | EB1 |
| p140Cap | - | EB1 |
| CDK5RAP2 | - | EB1 |
| RhoGEF2 (<i>Dm</i>) | - | EB1 |
| DDA3 | - | EB1 |
| Ch-TOG | Msps (<i>Dm</i>) XMAP215 (<i>XI</i>) Stu2 (<i>Sc</i>) | EB1 |
| LIS1 | NudF (<i>An</i>) | CLIP-170, p150 ^{glued} |
| NudA (<i>An</i>) | Dynein heavy chain | p150 ^{glued} , LIS1 |

Figure 15 : Tableau récapitulatif de l'interaction entre les différentes protéines du bout (+) des microtubules. (Adaptée de Mikerse et al., 2008)

b Les protéines du bout (-)

Comme dit précédemment, il existe, parmi les + TIPs, des protéines qui ciblent de façon spécifique l'extrémité négative des MTs. Contrairement aux nombreuses études réalisées sur l'extrémité + du MT, l'extrémité négative des MTs est un des aspects les moins étudiés et compris du MT dans leur comportement, leur organisation et leur régulation. Il est cependant accepté depuis longtemps que dans la cellule, l'extrémité (-) des MTs est coiffée pour prévenir leur dépolymérisation et/ou croissance. Cependant, la nature de ces coiffes est longtemps restée inconnue. Des études récentes ont cependant permis de mettre en évidence l'existence de protéine interagissant avec et ayant un effet sur cette extrémité.

La première protéine à avoir été identifiée comme étant capable d'avoir un effet sur l'extrémité (-) fut la protéine Patronin dont l'absence, chez la drosophile, montrait une réduction sévère du nombre de microtubules en interphase (Goshima et al., 2007). En 2010, Goodwin et Vale ont montré de façon claire que la protéine Patronin agissait comme un

inhibiteur spécifique de la dépolymerisation du bout (-) du MT. Ces auteurs ont également montré *in vitro* que la protéine Patronin interagissait de façon direct et sélective à l'extrémité négative du MT et permettait une résistance de la dépolymérisation de cette extrémité induite par les protéines de la famille des kinésines-13. En accord avec cet effet spécifique, elle ne permet pas la stabilisation de l'extrémité positive.

Il a par la suite été montré chez les mammifères l'existence d'une protéine homologue à la protéine patronin, initialement appelé Nezha, présente à l'extrémité négative des microtubules dans les jonctions adhérentes cellules-cellules (Meng et al., 2008). Par la suite, la protéine Nezha a été intégrée dans la famille de protéine CAMSAP (Calmodulin-Regulatd Spectrin-Associated Protein). On distingue ainsi 3 gènes différents codant pour les protéines CAMSAP1, CAMSAP2 et CAMSAP3/Nezha (Baines et al., 2009). La plupart des espèces de vertébrés possèdent les trois CAMSAP/Patronin ou homologue. *in vivo*, les protéines CAMSAP2 et 3 ont été montrées comme liant l'extrémité moins des MTs (Meng et al., 2008 ; Tanaka et al., 2012) et l'ensemble des protéines CAMSAPs a été montré comme étant capable *in vitro* de se lier à l'extrémité (-) (Hendershott et Vale, 2014). Comme pour la protéine Patronin, les protéines CAMSAPs sont capable *in vitro* de protéger l'extrémité (-) de la dépolymérisation induite par la kinésine-13. De plus, les protéines CAMSAP2 et 3 diminuent considérablement voire bloquent la croissance de cette extrémité (Hendershott et Vale, 2014 ; Jiang et al., 2014) (Figure 16).

En dépit de leur activité commune à lier l'extrémité négative des MTs, les différentes CAMSAPs montrent des propriétés différentes en accord avec leur efficacité à coiffer les MTs en croissance. Ces auteurs ont ainsi montré que la protéine CAMSAP1 et Patronin se déplace le long du MT jusqu'à l'extrémité (-) et, de façon similaire aux + TIPs, se dissocieraient après incorporation de la tubuline, tandis que les protéines CAMSAP2 et 3 semblent rester fortement associées à la lattice du MT après l'incorporation de la tubuline et diminuent voire même suppriment beaucoup plus efficacement la polymérisation de cette extrémité (Hendershott et Vale, 2014 ; Jiang et al., 2014).

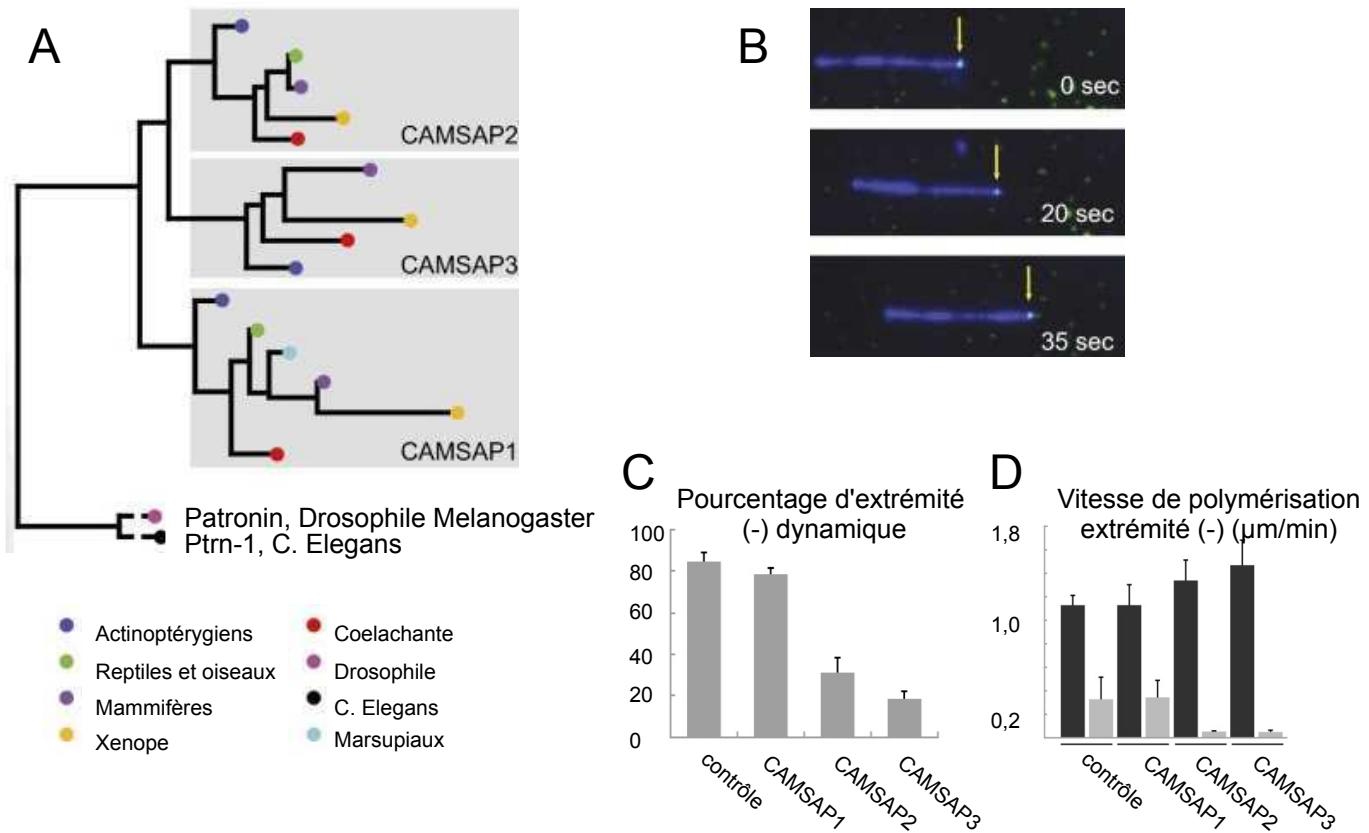


Figure 16 : Classification et effets des protéines de l'extrémité (-) des MTs.

A : La majorité des espèces de vertébrés présente la présence des trois protéines CAMSAPs/Patronin. La drosophile et le vers C. Elegans ne possède quand à eux une seule protéine. B : Séquence d'images de vidéo-microscopie TIRF montrant une localisation spécifique de la protéine CAMSAP (en vert), désigné par la flèche jaune à l'extrémité (-) du MT (en bleu). C et D : Les protéines CAMSAPs stabilisent et diminuent la vitesse de polymérisation de l'extrémité (-) en particulier les protéines CAMSAP2 et 3 (D droite). Ces dernières ont même pour effet de réduire la dynamique de cette extrémité et de la figer (C droite). (Adaptée de Hendershott et Vale, 2014).

Ainsi, cette différence d'interaction et donc d'effet des différentes CAMSAPs pourrait jouer un rôle de régulation sur les MTs. Il a ainsi été montré *in vitro* que la décoration du MT par CAMSAP2 pouvait créer une amorce stable pouvant supporter des cycles répétés de croissance et décroissance de l'extrémité + des MTs.

Le mécanisme de reconnaissance du bout (-) (où la tubuline alpha est exposée) par les protéines CAMSAPs et Patronin reste flou. Ces protéines sont capable de lier l'extrémité de MTs non dynamique stabilisés avec du GMPcpp (présentant un nombre de protofilaments inférieure ou égale à 13), suggérant que les protéines peuvent reconnaître certaines structures uniques du à l'exposition des monomères d'alpha tubuline. Dans le cas de microtubules

dynamiques, l'addition de dimère de tubuline résulte en une accumulation du nombre de CAMSAPs déposés près de l'extrémité (-). L'affinité des différentes CAMSAPs pour la lattice apparaît être relativement faible, cependant une fois déposées à l'extrémité, les CAMSAPs adjacentes pourraient interagir de façon coopérative pour renforcer leur liaison aux MTs (Henderschott et Vale, 2014).

III Les Protéines MAP6

Les protéines MAP6, ou STOPs (Stable Tubule Only Peptide), sont des protéines initialement isolées à partir de préparation de MTs de rat et furent initialement décrites comme une protéine capable de lier la calmoduline avec la capacité de protéger les MTs de la dépolymérisation induite par le froid (Job et al., 1981; Pirollet et al., 1992; Bosc et al., 1996; Guillaud et al., 1998).

1. Les différentes isoformes et leurs fonctions

On retrouve en tout 6 isoformes différentes de la protéine MAP6, qui sont les isoformes MAP6-N, MAP6-E, MAP6-O, MAP6-A, MAP6-F et MAP6-48. Parmi ces isoformes, les protéines MAP6-N et MAP6-E sont deux isoformes spécifiquement neuronales initialement caractérisées chez le rat (Bosc et al., 1996 ; Guillaud et al., 1998). La famille d'isoformes de MAP6 est codée par un seul gène constitué de quatre exons sur le chromosome 11q14 chez l'homme et qui va donner l'intégralité des différentes isoformes par épissage alternatif (Denarier et al., 1998). L'exon 1 code pour la région N-terminale de la protéine ainsi que la région centrale, contenant une ou plusieurs répétitions de 46 acides aminés constituant les modules Mc. Le nombre de ces répétitions varie suivant les différentes espèces et au sein même d'une espèce. On trouve ainsi 5 modules Mc chez le rat contrairement à 1 seul chez l'homme. L'exon comporte également deux répétitions de 48 acides aminés, les modules Mn1 et Mn2, ainsi qu'un site de palmitoylation à l'extrémité N-terminale. L'exon 2 code pour un domaine linker et présente un domaine de 48 acides aminés, le module Mn3, semblable aux modules Mn1 et 2. L'exon 3 code pour une région riche en résidus Lysine et Arginine. L'exon 4 code quant-à-lui pour la partie C-terminale de la protéine constituée de 28 répétitions imparfaites de 11 acides aminés (figure 17).

a Les protéines MAP6-N et MAP6-E

Les protéines MAP6-N et MAP6-E sont toutes deux codées par le même promoteur (Aguezzoul et al., 2003). La protéine MAP6-N constitue l'isoforme complète de la famille de protéines MAP6. Elle est constituée de 952 acides aminés (145 kDa) et se retrouve exprimée majoritairement au stade adulte. La protéine MAP6-E est exprimée quant-à-elle au stade précoce du développement et dans le cerveau embryonnaire (MAP6-Early) et son expression reste constante dans le cerveau adulte mais se retrouve en quantité beaucoup plus faible en rapport avec la protéine MAP6-N. L'isoforme MAP6-E présente une taille plus petite (85 kDa) et se retrouve dépourvue de l'exon 4 par épissage alternatif. Elle ne contient donc pas les

répétitions C-terminales (Bosc et al., 1996 ; Guillaud et al., 1998 ; Aguezzoul et al., 2003) (Figure 17).

Dans les neurones, les protéines MAP6-N et MAP6-E sont principalement associées aux MTs et des études en microscopie électronique montrent que ces protéines sont majoritairement localisées au niveau de l'axone dans des ganglions dorsaux de rat et ne semblent pas avoir une localisation préférentielle, les protéines étant réparties de façon homogène sur l'axone (Guillaud et al., 1998). De plus, ces protéines sont également présentes au niveau des dendrites. Ces protéines ont en effet été montrées comme étant impliquées *in vivo* dans les compartiments post-synaptiques de la région CA1 de l'hippocampe (Andrieux et al., 2002).

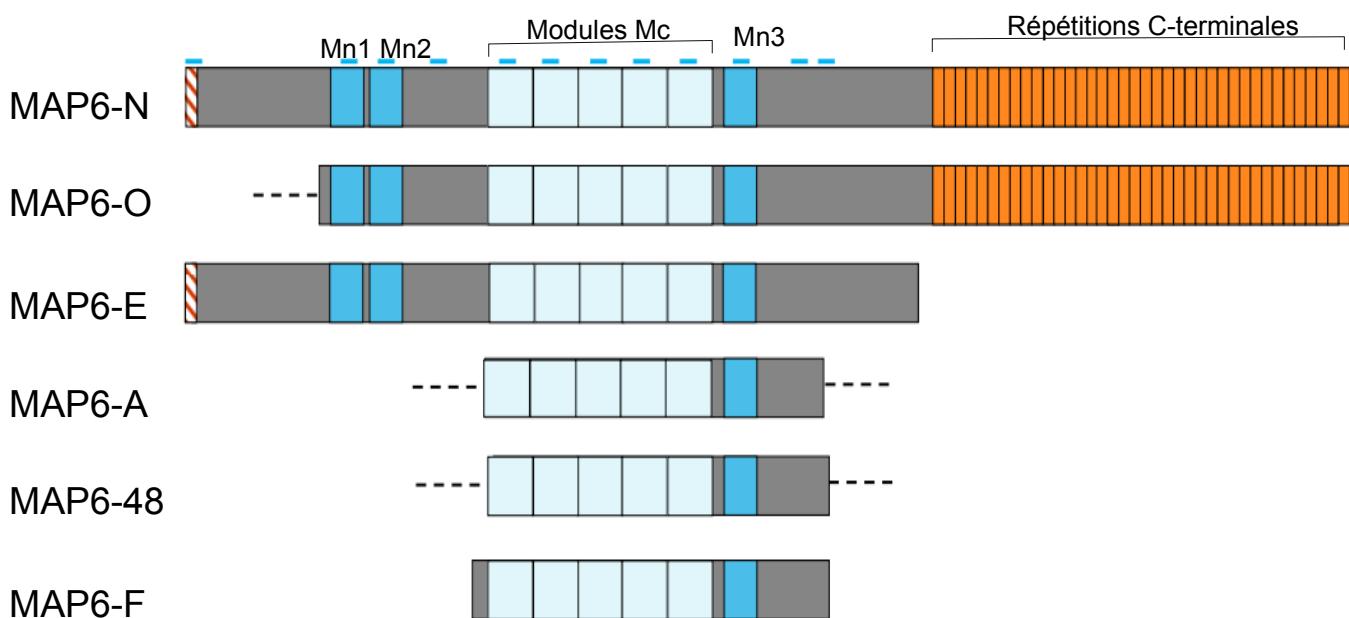


Figure 17: Représentation schématique de la famille de protéine MAP6.

La protéine MAP6-N correspond à l'isoforme complète de la famille des protéines MAP6. Les protéines MAP6-E et N sont des isoformes spécifiquement neuronales. La protéine MAP6-O est principalement exprimée dans les oligodendrocytes tandis que la protéine MAP6-A se retrouve dans les astrocytes. La protéine MAP6-F est exprimée de façon ubiquitaire. : domaine de liaison au microtubule à basse température (Module Mc). : domaine de liaison au microtubule à température physiologique (Module Mn). : domaine de palmytoïlation. : Domaine de liaison à la calmoduline. : répétition C-terminale de 11 acides aminés.

La stabilité des MTs au froid dans les neurones est un phénomène connu depuis longtemps (Webb et Wilson, 1980 ; Morris and Lasek, 1982 ; Baas et al., 1994) mais son origine était restée incomprise. La transfection d'ADNc codant pour la protéine MAP6-N et E dans des cellules HeLa dépourvu de la protéine MAP6 ont permis de montrer un rôle de la protéine dans la stabilisation des MTs au froid (Bosc et al., 1996) comme facteur de stabilisation et que cet effet est du à l'interaction de la protéine tout du long du MT (Andrieux et al., 2002). En plus de sa propriété à stabiliser les MTs au froid, les protéines MAP6-N et E sont également capable de stabiliser les microtubules à l'exposition à des drogues dépolymérisante comme le nocodazole (Figure 18). L'injection d'anticorps dirigés contre la région centrale de la protéine MAP6 dans des cellules PC12 a permis de mettre en évidence l'importance de la région centrale dans ces effets sur la dynamique des microtubules. En effet ceux-ci ont pour conséquences de ne pas modifier la structure du réseau microtubulaire et la croissance neuritique, mais supprime leur résistance au froid et au nocodazole. En revanche, l'inactivation de la protéine MAP6 dans ces cellules témoigne d'un rôle de la protéine lors de l'induction de la formation des neurites durant la différentiation neuronale (Guillaud et al., 1998).

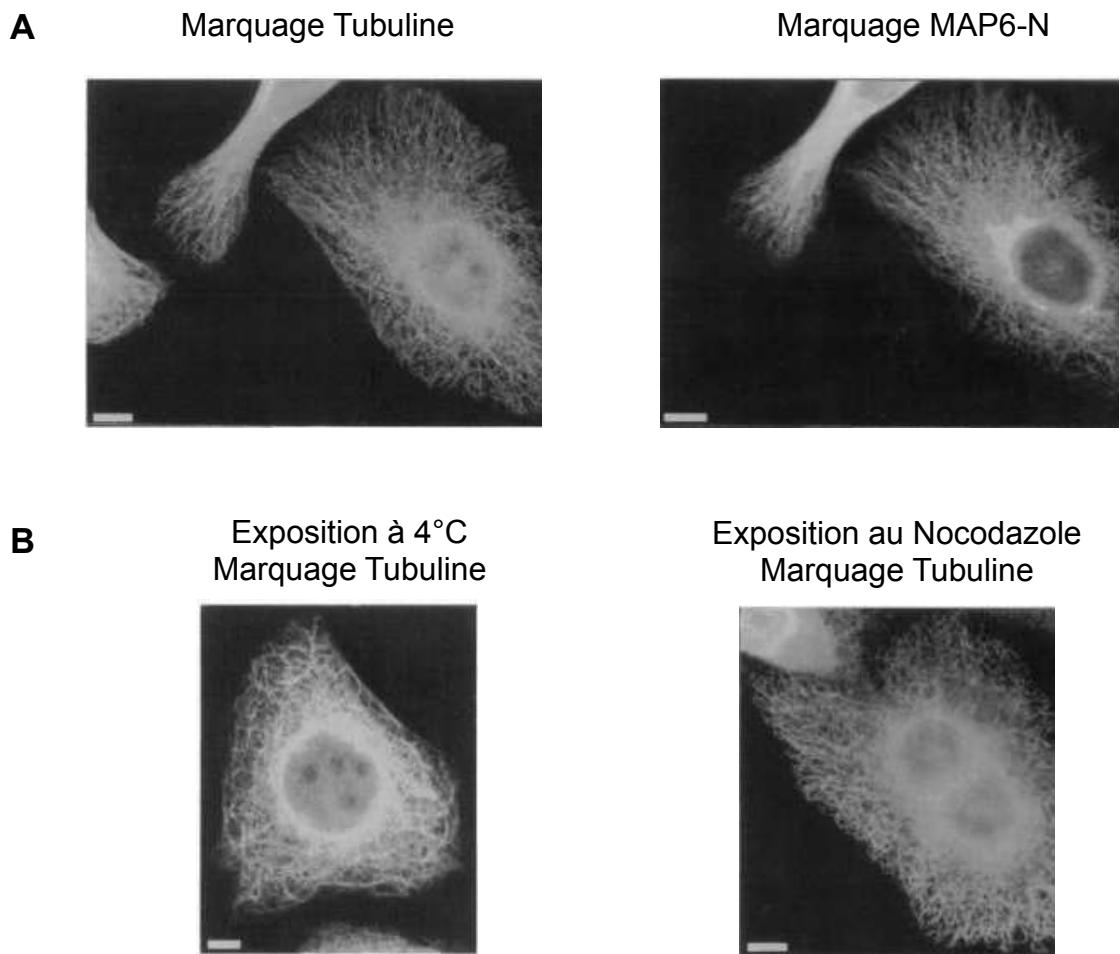


Figure 18: Stabilisation du réseau de MTs de cellule HeLa après transfection de la protéine MAP6-N.

Les cellules HeLa sont transfectées avec l'ADNc pour permettre l'expression de la protéine MAP6. (A) L'utilisation d'anticorps marqués dirigés contre la Tubuline et contre la protéine MAP6-N après fixation des cellules 48h après transfection permet de vérifier la bonne expression de la protéine MAP6-N. (B) Les cellules ainsi transfectées sont par la suite soit exposées au froid à 4°C soit exposées au Nocodazole (10 µM). Le réseau microtubulaire est observé grâce à des anticorps marqués. Adaptée de Bosc et al., 1996.

b Les isoformes non neuronales

Hormis ces deux premières isoformes exprimées spécifiquement dans les neurones, d'autres isoformes de la famille MAP6 ont été mis en évidence dans d'autres tissus (Pirollet et al., 1989). L'isoforme MAP6-F (pour MAP6-Fibroblastique) a été caractérisée dans une lignée cellulaire de fibroblastes. Elle constitue l'isoforme la plus petite de la famille MAP6 (42kDa) (Denarier et al., 1998) et ne contient presque que les répétitions centrales et se retrouve exprimée de façon ubiquitaire (Aguezzoul et al., 2003). L'isoforme MAP6-O est l'isoforme majoritaire des oligodendrocytes (89 kDa). Une autre isoforme, la protéine MAP6-A est quant-à-elle exprimée préférentiellement dans les astrocytes et présente une taille de 60 kDa.

Comme pour les isoformes MAP6-N et E, il a été montré dans des cellules HeLa transfectées que les autres isoformes permettait de protéger les MTs de la dépolymérisation induite par le froid. Cependant, dans le cas des isoformes MAP6-F et MAP6-A, les MTs ne sont pas stabilisés lors de l'exposition au nocodazole (Denarier et al., 1998 ; Galiano et al., 2004).

2. Les différents domaines de la protéine MAP6

a Domaines de liaison et stabilisation aux microtubules

Comme nous avons pu le voir, les isoformes de la protéine MAP6 permettent la stabilisation des MTs au froid et au nocodazole à température ambiante. Cependant, toutes les isoformes ne sont pas capable de permettre la stabilisation au froid et en même temps une stabilisation au nocodazole (Bosc et al., 1996 ; Denarier et al., 1998 ; Galiano et al., 2004). Ces résultats laissent donc penser à une compartimentation des effets de la protéine MAP6 sur les MTs. Un étude structure-fonction a ainsi été réalisée au sein du laboratoire sur des cellules HeLa avec les différentes isoformes de la protéine MAP6 et par la mise au point de différents mutants (Bosc et al., 2001). Deux types de domaines responsable de la liaison aux MT ont ainsi été mis en évidence : les modules Mc et les modules Mn (figure 17).

Les modules Mn ont été nommés ainsi car responsable de l'interaction et de la stabilisation des MTs à l'exposition au nocodazole à 37°C . Les modules Mc (pour Microtubule Cold) sont quant-à-eux capable de stabiliser les MTs à l'exposition au froid mais ne permettent pas une interaction avec les MTs à 37°C et donc leur stabilisation à température physiologique.

b Domaines de liaison à la calmoduline

Comme dit auparavant, les protéines MAP6 furent initialement décrites comme étant capable de lier la calmoduline (Pirollet et al., 1992). Douze sites de liaison à la calmoduline ont été identifiés et localisés chez le rat (Bosc et al., 2001; figure 17). Il a ainsi pu être observé que chaque site de liaison aux microtubules (les modules Mc et les modules Mn) chevauche un site de liaison à la calmoduline.

La liaison de la calmoduline sur les différents modules de la protéine MAP6 aurait pour conséquences un effet de compétition avec la liaison aux MTs et serait responsable d'une perte d'affinité de la protéine pour les MTs. La calmoduline pourrait ainsi servir de facteur de régulation de la protéine MAP6 et de son effet de stabilisation sur les MTs (Job et al., 1983 ; Pirollet et al., 1992).

c Sites de phosphorylation

Il a été montré à la fois *in vivo* et *in vitro* que la protéine MAP6 est phosphorylée par la Calcium/Calmoduline dépendante protéine kinase II (CamKII), qui est une enzyme clé de la plasticité synaptique (Lisman et al., 2002 ; Gleason et al., 2003). Cette phosphorylation intervient sur au moins deux sites distincts au sein de la protéine, cependant deux autres sites possible de phosphorylation par la CamKII ont été déterminés par analyse de la séquence. La phosphorylation de la protéine MAP6 inhibe son interaction avec les MTs *in vitro*. *In vivo* la forme phosphorylée ne co-localise plus avec les MTs dans des cultures de neurones primaires d'hippocampe (Baratier et al., 2006). La protéine MAP6 a été montrée dans ces neurones comme se relocalisant dans des régions dépourvues de MTs, en particulier au niveau des neurites au niveau des filaments d'actines (Figure 19). Enfin, dans des neurones différenciés, la protéine MAP6 phosphorylée se retrouve dans les synapses et co-localise avec des complexes protéiques synaptiques, contrairement à la protéine non-phosphorylée. La protéine MAP6 peut donc se dissocier des MTs en réponse à un flux de calcium liant la calmoduline induit par l'activation synaptique de façon direct, ou encore de façon indirect par phosphorylation par la protéine CamKII et pourrait ainsi jouer un rôle dans la plasticité synaptique.

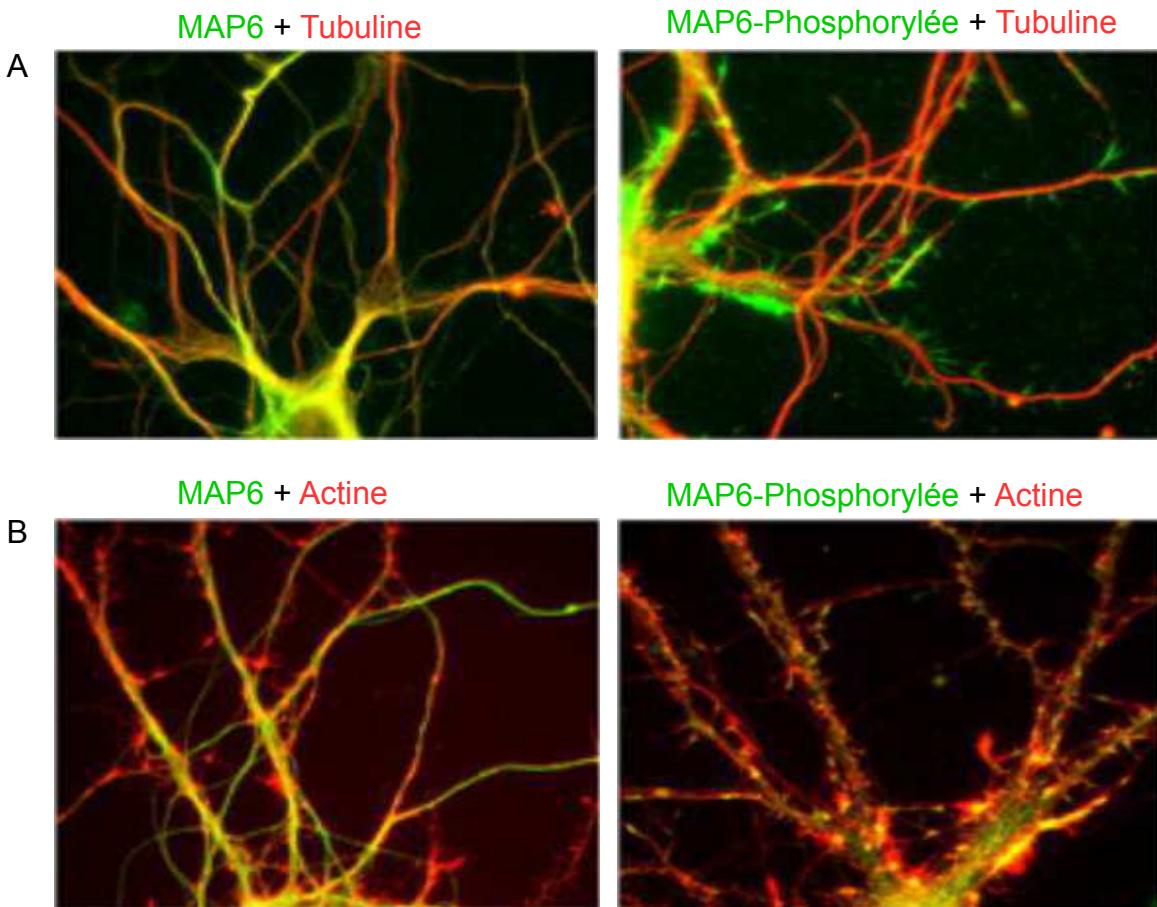


Figure 19: Localisation de la protéine MAP6 en fonction de son état de phosphorylation.

Des neurones d'hippocampe après 12 jours de différentiation ont été doublement marqués par immunofluorescence. La protéine MAP6-phosphorylée est détectée avec un anticorps dirigée contre un des sites phosphorylée de la protéine. A) et B) panel de gauche, la protéine MAP6 non phosphorylée co-localise avec les MTs, alors qu'elle ne co-localise pas avec l'actine. Panel de droite, la protéine phosphorylée n'est plus capable d'interagir avec les microtubules et se retrouve localisée au niveau des filaments d'actine. Adaptée de Baratier et al., 2006

d Sites de palmitoylation

La protéine MAP6 présente au niveau de son extrémité N-terminale un site de plamitoylation et permet sa localisation au niveau de l'appareil de golgi (Gory-Fauré et al., 2006). Plusieurs études ont montré la présence de matériel du golgi dans les épines ainsi que dans les dendrites distales (Pierce et al., 2000 ; Pierce et al., 2001). Ces vesicules golgiennes sont des structures mobiles et sont positionnées de façon à servir des régions dendritiques particulières ou des synapses, où elles pourraient jouer un rôle important dans la plasticité synaptique. L'habileté de la protéine MAP6-N à lier ces vésicules pourrait ainsi jouer un rôle dans cette plasticité (Andrieux et al., 2002). De plus, le domaine de palmitoylation de la protéine MAP6 pourrait

être impliqué dans l'interaction avec des vésicules ou du matériel membranaire autre que le golgi et pourrait ainsi jouer un rôle central de la réduction du pool de vésicules synaptiques observés chez la souris KO pour la protéine MAP6 (Andrieux et al., 2002).

3. La souris invalidée pour la protéine MAP6

De façon à mieux comprendre le rôle de la protéine MAP6, des souris déficientes pour l'expression de la protéine MAP6 ont été mises au point au sein du laboratoire. Pour cela, l'inhibition de l'expression des différentes isoformes de MAP6 est réalisée par insertion dans l'exon 1 du gène codant la protéine d'un gène rapporteur LacZ sous la dépendance du promoteur de MAP6 (Andrieux et al., 2002).

a Défauts Anatomiques

Les neurones primaires d'hippocampe des souris déficientes pour la protéine MAP6 en culture montrent une perte totale de la stabilité au froid des MTs (Andrieux et al, 2002) déterminant la protéine MAP6 comme le principal responsable de la stabilité des MTs à l'exposition au froid.

De façon surprenante, l'absence de la protéine MAP6 ne semble pas perturber la morphologie des neurones et la structure du réseau microtubulaire (Andrieux et al, 2002). Cependant, les cerveau de ces souris présentent des anomalies importantes avec un élargissement des ventricules cérébraux accompagnée d'une réduction du volume des structures corticales et diencéphaliques ainsi que des anomalies au niveau du bulbe olfactif (Powell et al., 2007 ; Benardais et al., 2010). De plus, il a récemment été montré au sein du laboratoire que la protéine MAP6 était capable d'interagir avec le récepteur de la Semaphorine 3E et joue un rôle crucial dans la cascade de signalisation de Sema3E qui pourrait ainsi expliquer, en plus des défauts de stabilisation des MTs par l'absence de la protéine, les défauts de développement axonal observés par une absence de réponse à la signalisation Sema 3E (Deloulme et al., 2015).

b Altération du système glutamatergique, dopaminergique et serotoninergique

Les souris KO MAP6 présentent une neurotransmission du système glutamatergique altérée. Le pool de vésicules synaptiques dans les terminaisons axonales de la région CA1 de l'hippocampe est réduit de 50% induisant des défauts de plasticité synaptique (Andrieux et al., 2002). Ceci a également pour conséquences une altération de la potentialisation et de la dépression synaptique à long terme (LTP et LTD). En adéquation avec ces résultats, avec un

rôle de la protéine MAP6 dans la plasticité synaptique, une diminution de la quantité de certaines protéines spécifiques des compartiments post et pré synaptiques a été observée chez ces souris. C'est le cas de la synaptophysine, la spinophilin ou encore de la protéine Vglut1, transporteur vésiculaire glutamatergique, en accord avec la réduction du nombre de vésicule observée (Andrieux et al., 2002). Les souris KO pour la protéine MAP6 présentent une hyperdopaminergie au niveau du système méso-limbique et des défauts très importants de l'arborisation serotoninergique (Brun et al., 2005 ; Fournet et al., 2010).

c Altération du comportement

Les souris KO MAP6 présentent de nombreux déficits comportementaux associés aux dysfonctionnement précédemment cités. On observe ainsi un trouble du comportement social et maternel, une hyperactivité motrice, un stress plus important à la nouveauté (Andrieux et al., 2002 ; Brun et al., 2005 ; Fradley et al., 2005 ; Bégou et al., 2007). Ces troubles semblent s'installer progressivement au cours de la vie de la souris, notamment lors du passage à l'âge adulte. L'ensemble de ces observations accompagnées des défauts des systèmes dopaminergique et glutamatergique sont apparentés aux symptômes observés chez les patients atteints de schizophrénie (Frankle et al., 2003 ; Ross et al., 2006) amenant à considérer la souris déléteée pour la protéine MAP6 comme modèle d'étude pour la maladie. En accord avec cette hypothèse, l'apparition de ces symptômes au cours du développement chez la souris mime la progression des altérations du comportement observée chez les patients schizophrènes (Lieberman et al., 2001).

De façon à confirmer cette hypothèse, les souris déléteées pour la protéine MAP6 ont été traitées avec différents neuroleptiques couramment utilisés sur des patients atteints de schizophrénie. Les souris montrent alors une amélioration notable des troubles comportementaux observés et une réduction des défauts cognitifs (Andrieux et al., 2002 ; Brun et al., 2005 ; Bégou et al., 2008 ; Delotterie et al., 2010). L'ensemble de ces résultats a ainsi amené la souris MAP6 à être un modèle d'étude pour la schizophrénie.

d Implication des microtubules dans la pathologie

L'épothilone D, composant analogue du taxol, est une drogue capable de traverser la barrière hémato-encéphalique et qui interagit directement avec la tubuline pour permettre la stabilisation des MTs et utilisé en cancérologie pour sa capacité à figer le réseau mitotique (Kolman et al., 2004 ; Wang et al., 2005). Chez les souris KO pour la protéine MAP6, un traitement par l'épothilone D permet une réduction des déficits de plasticité synaptique et une

amélioration des troubles du comportement (Andrieux et al., 2006). L'ensemble de ces résultats, couplé avec l'effet stabilisateur de la protéine MAP6 sur les MTs, met en évidence une implication, au moins en partie, des MTs et de MAP6 dans les capacités cognitives.

IV Actine

1. Monomère d'Actine

Les filaments d'actine résultent de l'assemblage d'une protéine monomérique, l'actine G (pour actine globulaire) qui est comme son nom l'indique une protéine globulaire de 43kDa qui se retrouve fortement exprimée dans les cellules eucaryotes (elle peut représenter jusqu'à 15 % de la masse totale protéique des cellules) et fut décrite pour la première fois en 1942 par Straub. La séquence des gènes codant pour l'actine est conservée jusqu'à 80% entre les différentes espèces et au sein d'une même espèce l'actine G peut exister sous différentes isoformes. Ainsi, chez l'homme, on distingue 6 isoformes différentes d'actine G appartenant à trois types issus de gènes différents. On trouve 3 isoformes différents d'actine α , spécifique des cellules musculaires, 1 isoforme d'actine β et enfin 2 isoformes γ , présentent dans tous les autres types cellulaires (Khaitlina et al., 2001). La structure du monomère d'actine obtenue par cristallographie montre que la protéine d'actine est séparée en deux domaines par un sillon au sein duquel se trouve le site de fixation au nucléotide ATP ou ADP (Adénosine Tri-Phosphate ou Di-Phosphate) ainsi qu'un site de fixation à un cation divalent tel que le Magnésium 2+ ou le Calcium 2+. L'actine G est polarisée, avec une extrémité dite pointue et l'autre dite barbée (Figure 20).

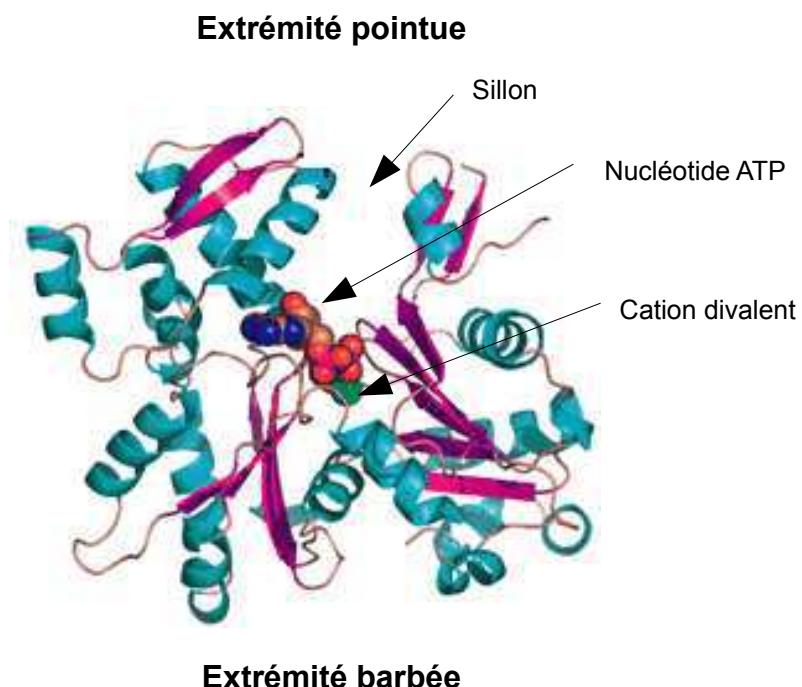


Figure 20: Représentation schématique du monomère d'actine. Le monomère d'actine se présente sous forme d'une protéine globulaire avec en son centre un sillon dans lequel vient se fixer l'ATP et le cation divalent. (D'après Rould et al., 2006).

Dans la cellule, l'actine globulaire est préférentiellement associée à un cation Mg²⁺ et se retrouve majoritairement complexée à l'ATP, l'affinité pour celui-ci étant supérieure à celle pour l'ADP. De plus la demi-vie de l'hydrolyse de l'ATP est augmentée lorsqu'il est lié à l'actine. En absence de ces deux éléments, l'actine se dénature facilement.

2. La structure du filament d'actine

Le filament d'actine, actine F pour actine filamenteuse où encore microfilament, est un des constituants majeurs du cytosquelette des cellules eucaryotes. L'actine F va jouer un rôle important notamment dans la mobilité cellulaire avec la mise en place de l'émission de lamellipodes, dans le maintien de certaines structures comme les jonctions adhérentes ou les microvillosités des cellules épithéliales mais aussi à une échelle plus importante dans la contraction musculaire en interagissant avec la myosine.

Le filament d'actine F est composé de deux polymères d'actine G qui s'enroulent l'un autour de l'autre formant un arrangement en double hélice d'un diamètre de 5 à 8 nm. Des modèles structuraux du filament d'actine ont pu être établis par microscopie électronique et des études récentes en cryo-ME ont permis de déterminer sa structure (Holmes et al., 1990 ; Murakami et al., 2010). Le tour d'hélice comporte 13 monomères d'actine G et présente une longueur de 37 nm. Du fait de la structure du monomère d'actine G, l'actine filamenteuse, comme le microtubule, présente une structure polarisée avec une extrémité barbée et une extrémité pointue. Ainsi, le site de liaison à l'ATP se situe vers l'extrémité pointue. Les nouvelles sous-unités sont quand à elles préférentiellement incorporées à l'extrémité barbue lors de la polymérisation du filament (Figure 21).

In vitro, la nucléation et polymérisation de l'actine F nécessite, comme pour les microtubules, une concentration minimale d'actine G dite concentration critique de nucléation. Celle ci est différente pour l'extrémité pointue et barbée expliquant la vitesse d'incorporation différente entre les deux extrémité. La concentration critique pour l'extrémité barbée est ainsi de 0,1 µM tandis que celle de l'extrémité pointue est de 0,8 µM. La polymérisation va également nécessiter la présence d'ATP ainsi que des conditions proches des conditions physiologiques en sel (Yanagida et Oosawa, 1975 ; Pollard et al., 2000).

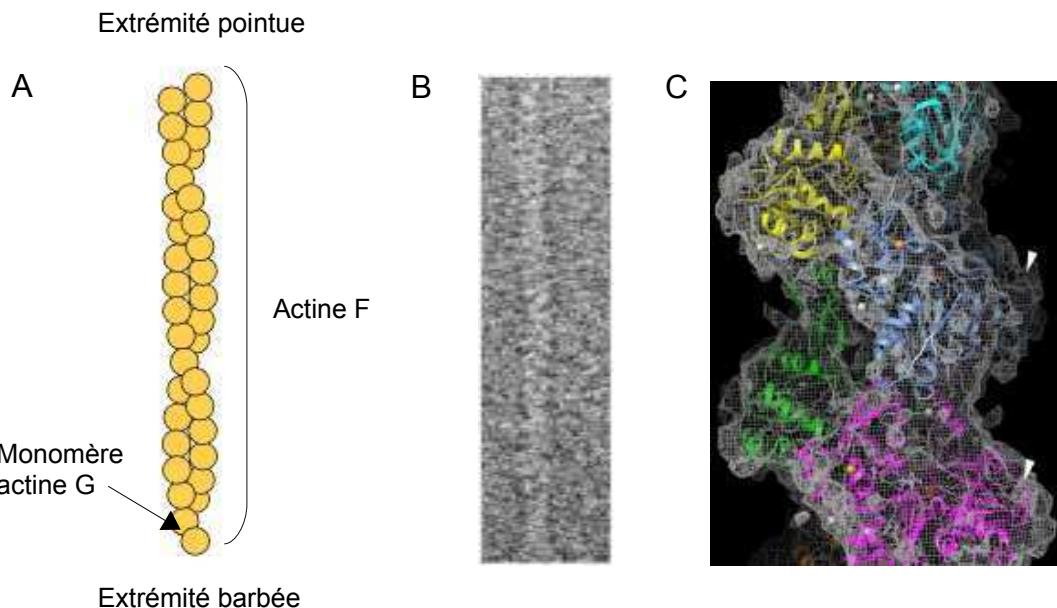


Figure 21: Strucure du filament d'actine.

A : Schéma représentatif de la double hélice d'actine F résultant de l'assemblage de monomère d'actine G. Cet assemblage est polarisé avec une extrémité pointue et l'autre barbée du fait de la polarité de l'actine G. B : Image en cryo-ME d'un filament d'actine. C : Schéma tridimensionnelle du filament d'actine, chaque monomère étant représenté dans une couleur différente. Les sphères oranges représentent les cations divalents. Les flèches blanches pointent l'extrémité N-terminale des sous-unités d'actine (d'après Murakami et al 2010).

Le processus de polymérisation de l'actine *in vitro* se découpe classiquement en trois phases (Carlier, 1991). La première étape, dite étape de nucléation, consiste en l'assemblage de monomères d'actine G sous la forme de dimères voire de trimères d'actine appelés alors noyaux. Cette première étape est une étape lente et défavorable thermodynamiquement. Si la concentration en monomères est supérieure à la concentration critique, l'actine G s'assemble en filaments à partir des noyaux. Les trimères d'actine G adoptent une conformation hélicoïdale, deviennent thermodynamiquement stable et la polymérisation commence aux deux extrémités du filament d'actine constituant la seconde phase dite phase d'elongation. La deuxième étape est rapide au cours de laquelle les monomères d'actine s'additionnent aux extrémités barbées et pointues du filament en cours de formation. Au cours de cette incorporation, il y a alors hydrolyse de l'ATP en ADP. L'actine G sous forme de filament est alors incapable d'échanger son nucléotide et reste sous une forme lié à l'ADP. 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 (Figure 22).

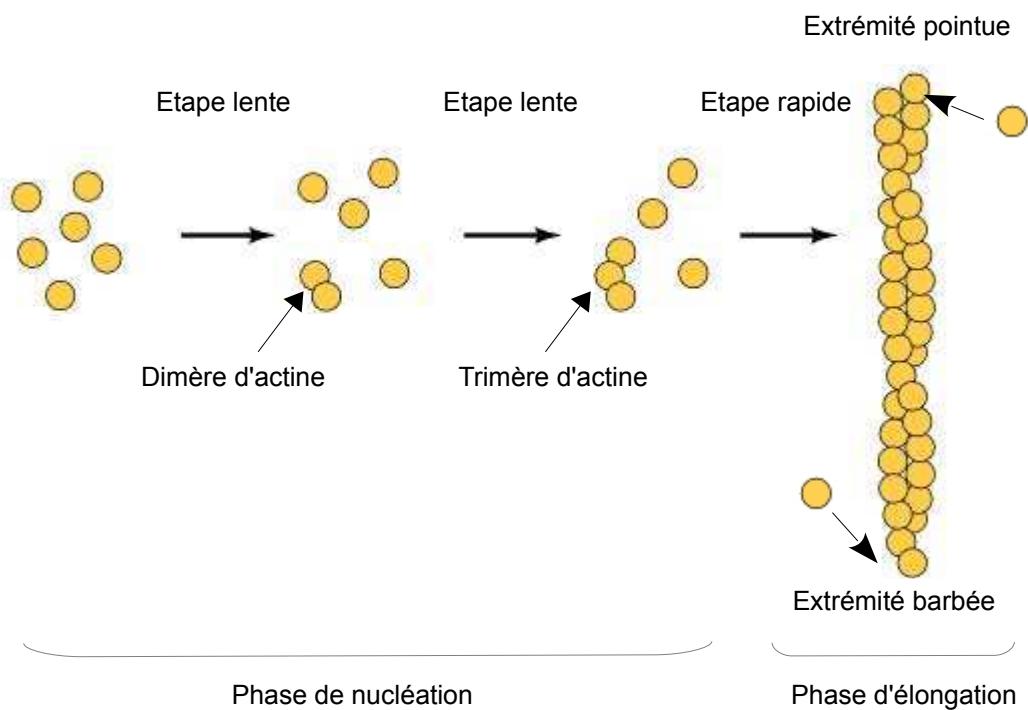


Figure 22: Mécanisme de nucléation et polymérisation de l'actine.

L'actine F passe par une première étape lente et thermodynamiquement instable permettant la formation de dimères et trimères d'actine G. Les trimères d'actine G vont ensuite servir de noyaux nucléateurs pour les filaments d'actine. L'ajout de monomères se fait plus rapidement à l'extrémité barbée qu'à l'extrémité pointue.

Enfin dans la troisième et dernière phase, dite phase stationnaire, l'actine G entre dans un état d'équilibre entre sa forme monomérique et filamentanteuse qui intervient lorsque la concentration d'actine G libre devient égale à la concentration critique de nucléation. A ce moment, la longueur global du filament ne varie pratiquement pas cependant le filament n'est pas figé et reste dynamique. En effet les monomères d'actine présent à l'extrémité pointue se dissocient du filament et sont alors capables d'échanger de nouveau leur nucléotide ADP en ATP et vont ainsi migrer vers l'extrémité barbée pour être de nouveau incorporés. C'est le processus de « tapis roulant », ou « treadmilling » qui fut décrit pour la première fois en 1976 par Wegner et al (Figure 23).

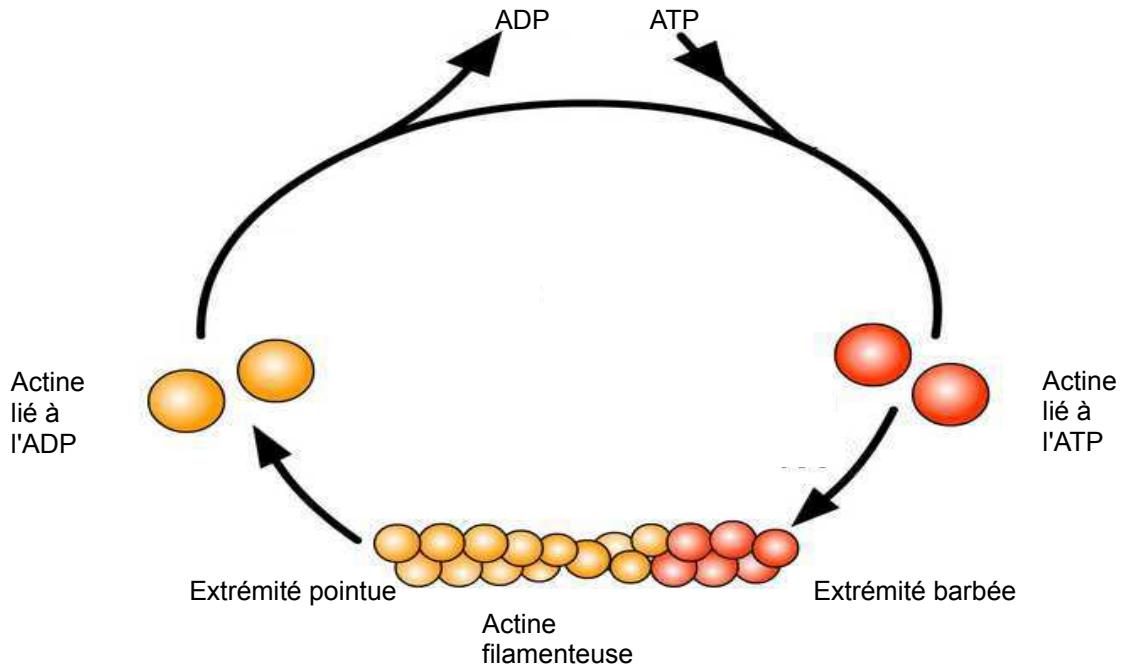


Figure 23: Schéma du mécanisme de « treadmilling » à l'état stationnaire. Les monomères d'actine liés à l'ATP s'ajoutent à l'extrémité barbée. L'hydrolyse de l'ATP se produit au sein du filament. Les monomères d'actine présent à l'extrémité pointue se dissocient quand à eux du filament, perdent leur ADP pour se réassocier à l'ATP et migrent vers l'extrémité barbée pour être de nouveau incorporés au filament.

La vitesse de dissociation au niveau de l'extrémité pointue au cours du « treadmilling » est cependant extrêmement lente. Or dans la cellule le pool d'actine G libre est important permettant une polymérisation rapide et un remodelage rapide du réseau d'actine de façon à répondre efficacement et rapidement aux besoins de la cellule. Ainsi *in vivo* différents facteurs vont permettre de contrôler et favoriser ou défavoriser l'assemblage de l'actine filamenteuse.

3. Protéines régulatrices de l'actine

On distingue plus de 60 familles de protéines capables d'interagir avec l'actine dénommées ABPs, pour Actin Binding Proteins. Elles peuvent être regroupées en plusieurs grandes familles suivant leurs effets sur la dynamique ou la structure de l'actine. On trouve ainsi des protéines qui vont permettre de nucléer des filaments d'actine, d'autres vont permettre de séquestrer et/ou maintenir l'actine G libre. Certaines vont être impliquées dans la dépolymérisation et enfin d'autres protéines vont permettre d'organiser les filaments d'actine en des structures plus élaborées.

a Les protéines nucléatrices

Comme nous l'avons vu précédemment, les premières étapes pour permettre la nucléation des filaments d'actine sont thermodynamiquement défavorable. Ainsi dans la cellule certaines protéines vont favoriser ces premières étapes. A ce jour, 3 types de nucléateurs ont été identifiés. Parmi ces nucléateurs sont présentes les formines, qui permettraient de stabiliser les dimères et trimères d'actine pour servir de noyaux nucléateur (Pruyne et al., 2002 ; Pring et al., 2003). Une autre protéine capable de nucléer l'actine est la protéine Spire qui contient 4 domaines d'interaction avec l'actine G. La protéine Spire pourrait ainsi lier plusieurs molécules d'actine en même temps de façon à favoriser la formation des dimères et trimères d'actine mais aussi de les stabiliser (Quinlan et al., 2005). Le dernier nucléateur est le complexe Arp2/3 qui se retrouve impliqué dans de nombreux processus cellulaires en particulier dans la mobilité cellulaire avec l'expansion des lamellipodes grâce à la formation de réseaux d'actines branchés (Mullins et al., 1998 ; Svitkina et Borisy, 1999). Contrairement aux deux nucléateurs précédent, le complexe Arp2/3 permet la nucléation de filament d'actine à partir d'un filament d'actine pré-existant en interagissant avec le filament d'actine et mime un complexe dimérique d'actine du fait de la forte homologie structurale entre l'actine et les protéines Arp 2 et Arp3 et sert ainsi de noyaux nucléateur avec un angle de 70° par rapport au filament pré-existant (Blanchoin et al., 2000).

b Protéines séquestratrices de l'actine

De façon à répondre rapidement aux besoins de la cellule, celle-ci se doit de préserver un stock d'actine G libre. Parmi ces facteurs se trouve la profiline. Cette dernière est capable de se lier à l'actine G libre au niveau de sa face barbée et ainsi inhiber la formation des dimères et trimères d'actine responsable de la nucléation. La profiline va également jouer un rôle de séquestration des monomères d'actine G maintenant une quantité d'actine libre dans la cellule (Almo et al., 1994 ; Kang et al., 1999 ; Pollard et al., 2000). De façon intéressante il a également été montré que l'actine ainsi séquestrée en présence de profiline permettait lors de son utilisation une forte augmentation de la vitesse de polymérisation au niveau de l'extrémité barbée permettant une réponse encore plus efficace de la cellule (Pring et al., 1992 ; Watanabe et Higashida, 2004 ; Kovar et al., 2006). Un autre moyen d'empêcher l'utilisation de l'actine G libre est la présence de protéines qui vont être capable d'interagir avec l'extrémité barbée du filament d'actine et donc empêcher l'incorporation de nouveaux monomères. C'est le cas des « cappings protéines » ou encore des gelsolines activées en présence de fortes concentration de Ca²⁺ et va également permettre de disloquer le filament d'actine en plus d'empêcher sa repolymérisation (Harris et Weeds, 1984 ; Kiselar et al., 2003).

c Protéines déstabilisatrices

Comme nous l'avons vu, la dépolymérisation de l'actine au niveau de l'extrémité pointue lors du « treadmilling » est extrêmement lente. Ainsi de façon à conserver une quantité d'actine G libre pour la polymérisation, les cellules vont également accentuer le renouvellement de l'actine en facilitant le désassemblage des filaments. Les principaux facteurs de la dépolymérisation des filaments d'actine sont les protéines de la famille des ADF/cofiline (Actin Depolymerizing Factor), protéines hautement conservées entre les espèces et présentes chez tous les eucaryotes (Lappalainen et Drubin, 1997). Ces protéines permettraient un renouvellement de l'actine G dans le filament en induisant le découpage de ce dernier. Ceci aurait pour conséquence d'augmenter le nombre d'extrémité pointue et ainsi augmenter l'effet de désassemblage de l'actine tout en inhibant la polymérisation de l'extrémité barbée nouvellement créée par l'ajout d'une protéine de coiffe inhibant la polymérisation (Andrianantoandro et Pollard, 2006). La gelsoline a également été caractérisée comme étant capable d'induire des coupures au sein du microfilament.

La cofiline permet aussi une dissociation rapide du complexe d'Arp2/3 des filaments d'actines ainsi que des branchements créés par ce dernier en agissant par compétition directe pour le site de liaison sur le microfilament d'actine mais également par propagation de changements structuraux au sein de la structure du filament qui diminueraient l'affinité du complexe Arp2/3 (Chan et al., 2009).

De façon intéressante, la myosine a également été caractérisée, lorsque celle-ci est fortement présente au niveau de l'actine, comme étant capable de désassembler l'actine en lui imposant des contraintes mécaniques (Murrell et Gardel, 2012 ; Vogel et al., 2013). De plus elle semble uniquement permettre la réorganisation et le désassemblage des faisceaux d'actines anti-parallèle et n'affecte pas les faisceaux d'actines parallèles, ce qui va jouer un rôle important par exemple dans la fermeture de l'anneau contractile.

Au contraire de ces protéines capable de permettre le désassemblage des filaments d'actine, la cellule possède également des protéines capable de stabiliser et protéger les filaments. Ainsi la tropomyosine par exemple est capable de se loger dans le sillon du filament pour le stabiliser et aussi empêcher l'interaction avec les protéines déstabilisatrices de l'actine F (Weigt et al., 1990).

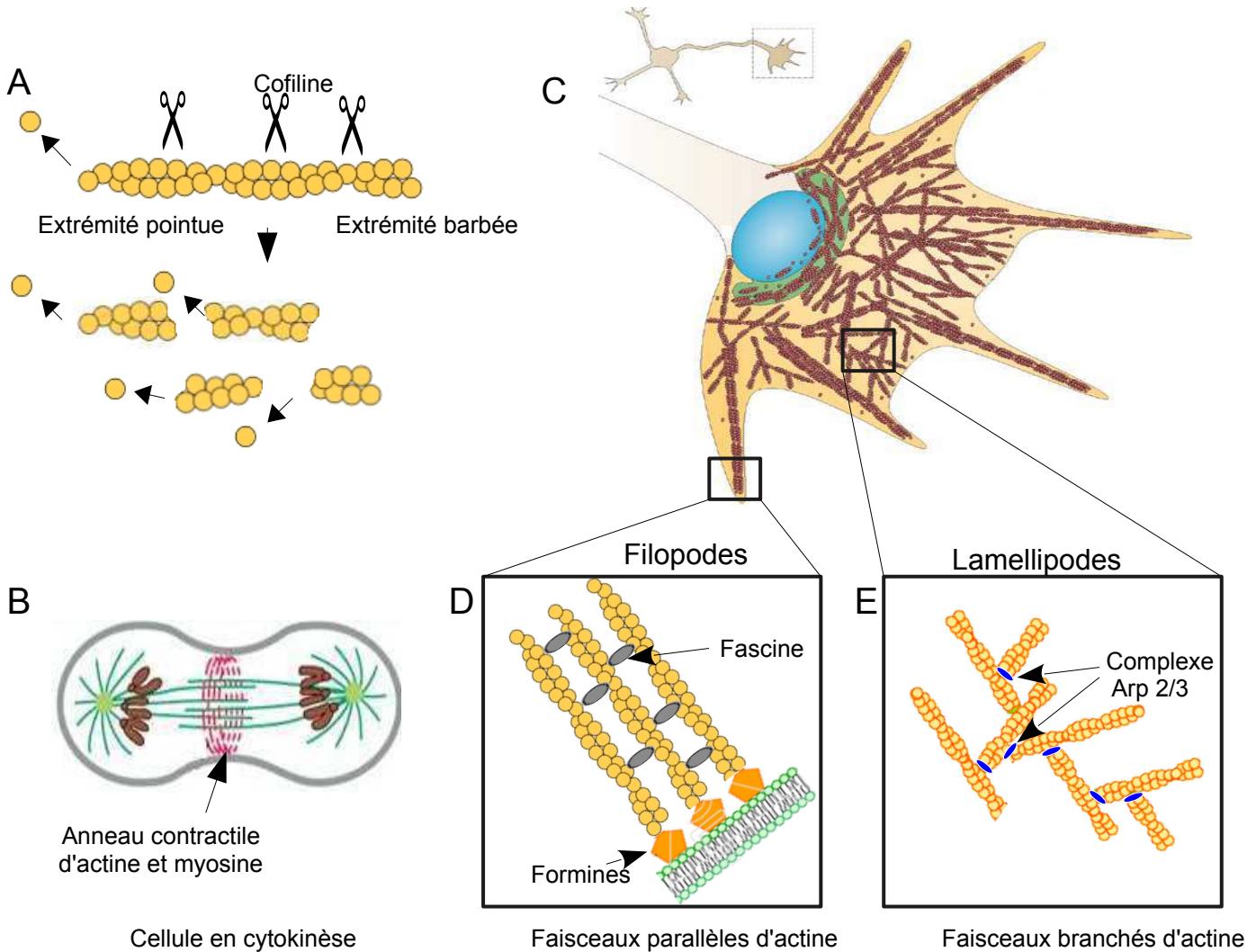


Figure 24: Organisation du réseau d'actine par différentes protéines ABPs.

A : les filaments d'actine peuvent être découpés par la Cofiline pour former des filaments de plus en plus petits permettant ainsi le renouvellement de l'actine G libre en augmentant le nombre d'extrémité pointue et ainsi le phénomène de désassemblage. B : Lors de la mitose, l'actine va permettre la séparation des deux cellules filles en formant au niveau du plan de division un faisceau d'actine anti-parallèle en interagissant avec la myosine et qui va progressivement se refermer pour permettre la cytokinèse. C : L'actine va jouer également un rôle important de mouvement comme par exemple au niveau du cône de croissance. Ainsi l'actine permet la formation des filopodes (D) qui sont remplis de faisceaux d'actine parallèles qui polymérisent à partir des formines. Les filaments sont maintenus entre eux grâce à la fascine. Tandis qu'au niveau des lamellipodes (E), l'actine adopte une forme branchée du au complexe Arp2/3 permettant la nucléation d'actine à partir d'un filament pré-existant et va permettre l'avancée du lamellipode et de la cellule.

d Protéines architecturales de l'actine

Enfin certaines protéines vont être capable d'intégrer avec l'actine de façon à modifier la structure des filaments pour assurer certaines fonctions au sein de la cellule. Ainsi certaines protéines vont permettre la formation de faisceaux de microfilaments qui va permettre la

formation et le maintien de structure comme les filopodes et les microvillosités (Vignjevic et al., 2006). L'on trouve parmi ces protéines la spectrine, la fascine, la fimbrine, l'α-actinine et la filamine. Dans les faisceaux, les filaments d'actine peuvent être orientés de façon parallèle (les extrémités barbées dans le même sens), anti-parallèle, ou encore de façon 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, forment des faisceaux parallèles (Klein et al., 2004 ; Sedeh et al., 2010). La filamine et l'α-actinine forment des faisceaux plus lâches et forme également des faisceaux parallèle d'actines filamenteuses (Washsstock et al., 1993 ; Schmoller et al., 2008 ; Courson et al., 2010). Des structures contenant des filaments d'actine anti-parallèles vont quand à elles être nécessaires pour la cytokinèse, consistant en la scission des cellules filles après la mitose, et s'effectue par la mise en place d'un anneau contractile qui va progressivement devenir de plus en plus petit pour permettre la séparation finale des cellules. C'est également le cas lors de la mise en place des adhésions cellule/cellule et de l'adhésion cellule/matrice (Théry et al 2006 ; Hotulainen et al 2006 ; Skau et al., 2011). 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 également capables de stabiliser les faisceaux d'actine dans une conformation anti-parallèle (Laporte et al., 2012).

Le complexe protéique Arp2/3, en plus de jouer un rôle dans la nucléation de nouveaux filaments d'actines va aussi permettre la formation de structure plus élaborées d'actine par son processus de nucléation à partir d'un filament pré-existant à un angle de 70°. Ceci va ainsi résulter en la formation d'un réseau d'actine branché dense qui va permettre à la cellule de conserver certaines structures comme celle par exemple des épines dendritiques mais ce complexe va également se retrouver dans des régions cellulaires caractérisées par une activité dynamique des filaments d'actines comme les lamellipodes (Figure 24). Chez les mammifères, le complexe Arp2/3 est également impliqué dans la phagocytose (May et al., 2000 ; Insall et al., 2001). Il a également été montré comme étant impliqué dans l'établissement de la polarité cellulaire et dans la migration de fibroblastes dans un modèle de blessure et guérison (Magdalena et al., 2003).

Dans les cellules, la dynamique et l'organisation du cytosquelette d'actine sont régulées par la famille des protéines Rho GTPase. Ces protéines existent sous deux formes, une forme active liée au GTP et une forme inactive liée au GDP qui vont intervenir dans la signalisation intracellulaire, elles-mêmes sous le contrôle de différents signaux extra-

cellulaires. Elles vont ainsi par exemple contrôler la formation des fibres de stress ou encore la formation de l'anneau contractile nécessaire à la cytokinèse via la protéine RhoA, les mouvements de la membrane plasmique au niveau des lamellipodes et la formation des filopodes grâce aux protéines Rac et Cdc42. Enfin une des cibles des protéines Rho est le complexe nucléateur Arp2/3, qui va ainsi pouvoir initier la formation d'un réseau d'actine branché. Le complexe Arp2/3 va également être stimulé par les protéines de la famille du complexe WASP (Wiskott-Aldrich Syndrome family Protein) en réponse à un stimuli en fonction des besoins de la cellule (Machesky et al., 1996 ; Higgs et Pollard, 2001).

Objectifs de la thèse

La protéine MAP6 initialement appelée STOP est une MAP neuronale étudiée par mon laboratoire d'accueil et ceci depuis une trentaine d'année (B Margolis, D Job, A Andrieux). MAP6 a été identifiée comme une protéine associée aux microtubules, son invalidation chez la souris a conduit à des défauts de neurotransmission, et neuro-anatomiques associés à des troubles cognitifs et comportementaux sévères réminiscents, des troubles psychiatriques chez l'homme en particulier de la schizophrénie avec sa composante de forte altération cognitive. Ces résultats laissaient supposer pour MAP6 des rôles plus divers que la seule liaison au microtubules. Ainsi durant les dix dernières années, MAP6 a été montrée comme interagissant avec l'actine et ses régulateurs (Arama et al., 2012; Baratier et al., 2006), avec des complexes de signalisation notamment ceux impliqués dans la signalisation Sema3E (Deloulme et al., 2015) et a été localisée à la densité post synaptique (Andrieux et al., 2002; Collins et al., 2005; Peng et al., 2004). Les fonctions de signalisation de MAP6 sont portée par ses domaines riche en proline (PRD) (Deloulme et al., 2015).

Les troubles comportementaux et biologiques des souris déficientes pour MAP6 sont améliorés par un traitement aux antipsychotiques (bloqueurs de la neurotransmission dopaminergique) ou aux antidepresseurs (inhibiteurs de la recapture de la sérotonine) (Andrieux et al., 2002 ; Begou et al., 2008 ; Fournet et al., 2012 ; Delotterie et al., 2010) mais également par un traitement avec l'epothilone D ou le Davunetide, deux drogues régulant la dynamique et la stabilité des microtubules (Andrieux et al., 2006; Fournet et al., 2012; Merenlender-Wagner et al., 2010). L'effet positif de ces drogues microtubulaires sur les altérations biologiques des souris déficientes en MAP6 laissent penser qu'au moins certaines d'entre elles pourraient résulter dans des défauts de la dynamique ou de la stabilité microtubulaire. Cependant, bien que l'effet de la protéine MAP6 sur les microtubules au froid a déjà été étudié, le rôle de la protéine MAP6 et ses effets sur les microtubules à 37°C n'avaient jusqu'à présent jamais été caractérisés.

Ainsi, après la mise au point de la production de protéines MAP6 recombinantes dans le système baculovirus, le premier objectif de ma thèse a été de répondre aux questions suivantes :

1/ La protéine MAP6 est-elle capable d'interagir directement avec les microtubules et quels sont les effets de la protéine sur la dynamique des microtubules ?

D'autre part, il est rapidement apparu que la protéine MAP6, en plus de réguler la dynamique des microtubules, avait un effet fort sur la structure de ces MTs amenant une autre question :

2/ Comment la protéine MAP6 modifie-t-elle la structure des microtubules et quelle nouvelle conformation ceux-ci adoptent ils ?

L'ensemble de ces études ont été réalisées en système reconstitué *in vitro* à partir de protéines purifiées et effectuées par diverses approches biochimiques et vidéo-microscopiques de façon à suivre en direct et à déterminer les effets de la protéine MAP6 sur la structure et la dynamique des microtubules.

Des études au sein du laboratoire ont également montré qu'en absence de la protéine MAP6, dans des neurones en culture, la densité d'épines dendritiques est réduite. Les épines sont des structures très riche en actine, et celles ci participent activement au maintien et la dynamicité de l'épine. Le laboratoire a ainsi commencé la caractérisation des interactions de MAP6 avec l'actine au sein des épines *in vivo* et j'ai pour ma part **3/ initier les études des interactions directes de MAP6 avec l'actine dans les systèmes acellulaires.**

Résultats

Article 1

Résumé de l'article "**MAP6-F Is a Temperature Sensor That Directly Binds to and Protects Microtubules from Cold-induced Depolymerization**" by C Delphin, D Bouvier, M Seggio, E Couriol, Y Saoudi, E Denarier, C Bosc, O Valiron, M Bisbal, I Arnal and A Andrieux. JBC 2012.

In vitro, les microtubules sont des structures très dynamiques qui alternent les phases de dépolymérisation et de polymérisation. Une de leur caractéristique extrêmement particulière est d'être sensible au froid, froid qui entraîne leur dépolymérisation. *In vivo*, les microtubules sont protégés d'une éventuelle exposition au froid par la famille de protéine MAP6/STOP. Cet effet à une importance toute particulière pour les animaux dont la température varie comme par exemple les animaux qui hibernent ou font de la torpeur. Cependant les mécanismes moléculaires exacts responsables de stabilisation des microtubules au froid par la protéine MAP6 n'avaient pas encore été élucidés : est ce un effet direct? un effet régulé par la signalisation cellulaire comme une phosphorylation?

Dans cette étude, nous avons montré à la fois *in vivo* et *in vitro* que la protéine MAP6 empêche la dépolymérisation des microtubules grâce à une interaction directe des modules suite à l'exposition au froid. De plus, il a été montré que l'interaction de la protéine avec les microtubules était très dynamique et dépendante de la température. En effet, la diminution progressive de la température entraîne un recrutement de la protéine MAP6-F (isoforme principalement constitué des modules Mc) sur les microtubules afin de prévenir leur dépolymérisation. Ainsi, la liaison aux microtubules est très faible à 37°C et augmente de façon significative lorsque la température descend en dessous de 20°C. Des études de dichroïsme circulaire ont également permis de montrer que les modules Mc voient leur conformation changer avec la diminution de température. Ce changement de conformation permet à la protéine MAP6 d'interagir avec les microtubules au froid et de les stabiliser. On peut donc considérer que la protéine MAP6 se comporte comme un senseur de température. Cependant les mécanismes par lesquels la protéine stabilise le microtubule reste flou, la protéine s'associe tout le long du MT, la protéine MAP6 pourrait stabiliser les protofilaments adjacents de façon à diminuer la fréquence de catastrophe et donc stabiliser ces microtubules.

En résumé cette étude a permis d'établir les bases moléculaire responsables de la propriété unique de MAP6, non partagée par les autres MAPs, à stabiliser au froid les microtubules : la présence des modules Mc dont la séquence en acides aminés est unique. La stabilisation des microtubules en cas de baisse de la température corporelle (torpeur, hibernation) semble cruciale et nécessaire pour préserver certaines fonctions vitales comme le fonctionnement du cerveau. On peut spéculer sur un rôle des microtubules stabilisés par MAP6 dans le transport axonal et/ou le maintien des mitochondries à proximité des synapses toujours actives, pendant l'hibernation.

MAP6-F Is a Temperature Sensor That Directly Binds to and Protects Microtubules from Cold-induced Depolymerization*

Received for publication, July 5, 2012, and in revised form, August 6, 2012. Published, JBC Papers in Press, August 17, 2012, DOI 10.1074/jbc.M112.398339

Christian Delphin^{†,‡}, Denis Bouvier[§], Maxime Seggio[‡], Emilie Couriol[‡], Yasmina Saoudi[‡], Eric Denarier[‡], Christophe Bosc[‡], Odile Valiron[‡], Mariano Bisbal^{‡,¶}, Isabelle Arnal[¶], and Annie Andrieux[‡]

From [†]Team 1 Physiopathology of Cytoskeleton; Commissariat à l'Energie Atomique, Institut National de la Santé et de la Recherche Médicale, U836-GIN iRTSV-GPC, Site Santé La Tronche, BP170, 38042 Grenoble Cedex 9, France, [§]the European Molecular Biology Laboratory, Grenoble Outstation, 6 rue Jules Horowitz, BP181, 38042 Grenoble Cedex 9, France, and [¶]Team 13 Dynamic and Structural Regulation of Cytoskeleton, Institut National de la Santé et de la Recherche Médicale, U836-GIN, Site Santé La Tronche, BP170, 38042 Grenoble, Cedex 9, France

Background: Microtubules are intrinsically cold-sensitive polymers, but cold-stable microtubules are observed in cells.

Results: Progressive temperature-dependent conformational change in MAP6-F coincides with its binding to microtubules and with its microtubule cold stabilization activity.

Conclusion: MAP6-F is a temperature sensor that protects microtubules from cold-induced depolymerization at temperatures ranging from 4 to 20 °C.

Significance: This work provides a better understanding of cellular microtubule stabilization under hypothermic stress.

Microtubules are dynamic structures that present the peculiar characteristic to be ice-cold labile *in vitro*. *In vivo*, microtubules are protected from ice-cold induced depolymerization by the widely expressed MAP6/STOP family of proteins. However, the mechanism by which MAP6 stabilizes microtubules at 4 °C has not been identified. Moreover, the microtubule cold sensitivity and therefore the needs for microtubule stabilization in the wide range of temperatures between 4 and 37 °C are unknown. This is of importance as body temperatures of animals can drop during hibernation or torpor covering a large range of temperatures. Here, we show that in the absence of MAP6, microtubules in cells below 20 °C rapidly depolymerize in a temperature-dependent manner whereas they are stabilized in the presence of MAP6. We further show that in cells, MAP6-F binding to and stabilization of microtubules is temperature-dependent and very dynamic, suggesting a direct effect of the temperature on the formation of microtubule/MAP6 complex. We also demonstrate using purified proteins that MAP6-F binds directly to microtubules through its Mc domain. This binding is temperature-dependent and coincides with progressive conformational changes of the Mc domain as revealed by circular dichroism. Thus, MAP6 might serve as a temperature sensor adapting its conformation according to the temperature to maintain the cellular microtubule network in organisms exposed to temperature decrease.

Microtubules are essential components of the cell cytoskeleton, being involved in cell division, cell migration and intracellular trafficking. Microtubules result from the polymerization of tubulin dimers in protofilaments that associate through lateral contacts (for reviews see Refs. 1–4). Microtubules are dynamic structures alternating growing and shrinking phases ended by catastrophes and rescues, respectively. *In vitro*, microtubule dynamics are under the control of the tubulin concentration and numerous other physico-chemical parameters (5–8). Among them, temperature plays a crucial role as microtubules depolymerize upon a temperature shift from 37 to 4 °C. This could be due to the modification of different dynamics parameters especially the increase of catastrophe and the disappearance of rescue events at such temperatures (9, 10). In a cold environment ectothermic organisms express tubulin variants able to assemble at temperatures below 4 °C and to resist to cold-induced depolymerization (11). The amino acid substitutions affect residues located at sites implicated in tubulin lateral contact and are thought to increase interactions between protofilaments (12). Among endotherms that contain cold-sensitive microtubules, some may undergo a significant drop in their body temperature during natural events. Indeed, during hibernation or torpor, body temperature can decrease by several degrees down to temperatures close to 0 °C depending on the species (13, 14). In human, deep hypothermia can occur during accidental events or be medically provoked to preserve tissues. During such events, the maintenance of a minimal network of microtubules is thought to be required for basal cellular functions. It has been shown that the main proteins able to protect microtubules against cold-induced depolymerization are the microtubule-associated proteins MAP6³ (also called STOP for Stable Tubule Only Polypeptide) (15, 16). MAP6 belongs to a family of proteins encoded by a single gene (16, 17). They are restricted to vertebrates and expressed in several tissues including brain, heart, muscle, kidney, lung, and testis (18).

* This work was supported by INSERM, CEA, University Joseph Fourier, and French National Research Agency Awards 2010Blan120201 CBioS (to A. A.).

[†] To whom correspondence should be addressed: Inserm U836, Equipe 1 Bâtiment Edmond J. Safra, Université Joseph Fourier, Site Santé à La Tronche, BP 170, 38042 GRENOBLE Cedex 9-France. Tel.: 33-456-520-539; Fax: 33-456-520-657; E-mail: christian.delphin@ujf-grenoble.fr.

[‡] Recipient of the Roche Pharmaceutic RPF program (AA team and F Hoffmann-La Roche Ltd, Basel, Switzerland).

³ The abbreviations used are: MAP, microtubule-associated protein; MEF, mouse embryonic fibroblasts; PIPES, piperazine-N,N'-bis(2-ethanesulfonic acid); EM, electron microscopy.

Microtubule Stabilization by MAP6

At the cellular level, MAP6 have been found in neurons, astrocytes, oligodendrocytes, fibroblasts, and pulmonary endothelium (16, 19–21). Depending on mouse strains, MAP6 isoforms contain a Mc domain composed of a 4 or 5 times tandemly repeated 46-residue motif. This Mc domain, when overexpressed in HeLa cells (that do not express any MAP6 variants), is able to stabilize microtubules against exposure to 4 °C (22).

In a previous study, it was shown that NIH/3T3 fibroblastic cells (16) mainly expressed the smallest MAP6-F isoform. In these cells, at 37 °C, microtubules are dynamic, non stable (as revealed by nocodazole sensitivity) (23) whereas they are stable at 4 °C. Concomitantly, MAP6-F relocates from the cytosol at 37 °C to the microtubule network upon chilling at 4 °C (16). These data suggest that microtubule stabilization by MAP6-F is dependent on the binding of MAP6-F to the microtubules. However, the cold sensitivity of cellular microtubules to temperatures between 37 and 4 °C and the effect of these temperatures on MAP6 binding to microtubules were unclear. Moreover, the exact mechanisms involved in the regulation of MAP6 interaction with microtubules under cold exposure have yet to be identified.

Here, we show that in the absence of MAP6, cellular microtubules depolymerize in a temperature-dependent manner as soon as the temperature decreases below 20 °C. In fibroblasts, which contain MAP6-F, microtubule cold resistance is directly correlated with a rapid and temperature-dependent interaction of MAP6-F with the microtubules. Using purified *in vitro* systems, we provide evidence that MAP6-F stabilizes microtubules via a direct interaction through its Mc domain. Furthermore, we found structural changes in the MAP6 Mc domain upon temperature modifications, indicating that MAP6 behaves as a “temperature-sensor” adapting its conformation to allow microtubule binding and preservation upon temperature drop.

EXPERIMENTAL PROCEDURES

Cell Culture—Mouse fibroblastic NIH/3T3 cells were grown at 37 °C in DMEM 4.5 g/liter glucose (Invitrogen) supplemented with 10% fetal bovine serum (Hyclone Laboratories Inc.), 50 units/ml of penicillin and 50 µg of streptomycin (Invitrogen). Human epithelial HeLa cells and mouse embryonic fibroblasts (MEF) prepared from either wild-type or MAP6-null mice as in Ref. 24, were maintained as for NIH/3T3 cells except that 1 g/liter glucose DMEM was used instead of 4.5 g/liter glucose DMEM.

Cell Cold Treatment and Permeabilization—For immunofluorescence analysis of cellular microtubule content, cells were plated 24 to 48 h before analysis on glass coverslips placed in B60 cell culture dishes. For analysis of time- and temperature-dependent effects on cellular microtubule content, coverslips were placed in culture medium complemented with 10 mM HEPES pH 7.4 in P24 culture dishes whose temperature was pre-equilibrated in water baths. For short incubation times of 1 min or less, incubations were done in PBS instead of culture medium. At the end of the indicated time, cells were washed with PBS at the incubation temperature and then permeabilized to wash out the soluble cell content through two 30 s incubations in OPT buffer (100 mM PIPES/KOH pH 6.75, 1 mM

MgCl₂, 1 mM EGTA, 10% glycerol, 0.5% Triton X-100) at the incubation temperature. Cells were then fixed in –20 °C methanol and processed for immunodetection. For immunofluorescence analysis of MAP6-dependent microtubule cold stability, NIH/3T3 cells on coverslips were treated as described above except that cells were permeabilized and washed (2 × 30 s) in PEMT buffer (OPT buffer without glycerol) at the incubation temperature and then dipped in 4 °C PEMT buffer for 10 min before methanol fixation.

Detection and Quantification of Cellular Microtubule Content by Immunofluorescence—Methanol-fixed cells were incubated for 30 min in PBST (PBS buffer plus 0.3% Tween 20) plus 5% (v/v) of normal goat serum (NGS). Mouse monoclonal anti-tubulin α3A1 antibody (24) (dilution 1/6,000) in PBST plus 1% NGS was then added and incubated for 1 h at room temperature. Coverslips were washed five times with PBST and then incubated for 45 min with Alexa488-coupled anti-mouse secondary antibody (Invitrogen). Coverslips were washed five times with PBST, once with PBS, incubated for 15 min with PBS containing 100 ng/ml of Hoechst 33258, briefly rinsed with PBS, ethanol dried, and mounted on glass slides using DAKO mounting medium. Images were acquired using Axioskop 50 (Carl Zeiss Micro Imaging) microscope and Metamorph (Universal Imaging Corp.) software. For microtubule quantification, at least 12 pictures of 30 to 50 cells were taken for each condition. The surface covered by microtubules was quantified using ImageJ software (25) and reported to the number of cells in each corresponding picture. Statistical analysis and graphs were made using Excel software (Microsoft).

Immunofluorescence Analysis of MAP6-F Association with the Microtubule Network—MEF cells grown on coverslips were placed in culture medium complemented with 10 mM HEPES pH 7.4 and either kept at 37 °C or incubated at 4 °C for 30 min. Cells were permeabilized in OPT buffer and fixed with 3.7% paraformaldehyde, 0.5% glutaraldehyde, and 0.1% Triton X-100 in PBS, followed by a treatment with 1 mg/ml NaBH₄ in PBS for 10 min. Tubulin was detected using α3A1 antibody (1/1,000) and MAP6-F with polyclonal 23C antibody (1/1,000). Images were recorded with an Axioskop 20 microscope (Carl Zeiss) (Leica) coupled with Coolnaps ES camera (Roper Scientific) driven by Metaview Software (Universal Imaging).

Video Microscopy Analysis of mCherry-MAP6-F Localization in HeLa Cells—pmCherry-C2 vector was obtained by replacing the EGFP sequence of pEGFP-C2 vector (Clontech) by the mCherry sequence from pmCherry-C1 (Clontech) using AgeI/BsrG1 cloning sites. mCherry-MAP6-F expression vector was then constructed by inserting MAP6-F cDNA from p16C-APa (16) into pmCherry-C2 vector using XhoI/KpnI cloning sites. HeLa cells transfected with pmCherry-MAP6-F using Amaxa technology (Lonza) were grown on coverslip for 24 h and then placed in a perfusion chamber at 37 °C. Cell culture medium was progressively cooled from 37 °C to 15 °C during the course of the experiment (15 min). Images were recorded every minute on a DMI6000 microscope (Leica) with an EMCCD Quantem camera (Roper Scientific) driven by MetaMorph Software (Universal Imaging).

Western Blot Analysis of MAP6-F Recruitment to Cellular Insoluble Material—For analysis of the temperature-dependent solubility of MAP6-F in NIH/3T3 cells, cells were grown in B35 cell culture dishes. The cell culture medium was renewed with the same medium supplemented with 10 mM HEPES pH 7.4, equilibrated at the temperature of the assay and the culture dishes were placed in a temperature-controlled water bath. For incubation times of 1 min or less, PBS was used instead of cell culture medium. Dishes were incubated in water bath at the temperature and for the time indicated. Dishes were rinsed with 1 ml of PBS at incubation temperature and permeabilized with 400 μ l of OPT at the incubation temperature. After 1 min, OPT medium was recovered and added to 100 μ l of 5 \times Laemmli buffer (soluble extract). Insoluble cell material was recovered in 500 μ l of 1 \times Laemmli buffer. Extracts were run on 12% SDS-PAGE and transferred onto nitrocellulose membranes. Membranes were blocked with 5% nonfat milk in TTBS (50 mM Tris-HCl, pH 7.4, 150 mM NaCl, 0.3% Tween 20). Membranes were probed in the same buffer with affinity-purified rabbit anti-MAP6 antibody 23C (dilution 1/5,000) or monoclonal anti-tubulin antibody α 3A1 (1/10,000). HRP-coupled secondary antibodies were incubated in TTBS and probed using Pierce ECL Substrate (ThermoScientific) and light sensitive film (Fischer Scientific).

Western Blot Analysis of MAP6 Expression in NIH/3T3, HeLa, MEF^{+/+}, and MEF^{-/-}—Cells grown on B30 cultures dishes were washed with PBS and lysed by addition of 400 μ l of Laemmli buffer. Extracts were normalized for the quantity of tubulin by semi-quantitative Western blot using α 3A1 antibody. MAP6 proteins expression was then analyzed by Western blot as described above using a mixture of both anti-MAP6 23N and 23C polyclonal antibodies at 1/5,000 dilution each.

MAP6-F and Mc Domain Expression and Purification—MAP6-F was cloned into pFAST-BAC HTb as previously reported (22). The Mc domain coding sequences were cloned into NcoI/XhoI cloning sites of pFAST-BAC HTb in frame with the His₆ tag. Recombinant baculoviruses were obtained and amplified in Sf9 insect cells (Invitrogen). Protein expressions were carried out in High Five insect cells grown in suspension in Express Five culture medium (Invitrogen). For His-tagged MAP6-F purification, 500 ml of infected High Five cell culture were spun down at 4 °C for 5 min at 125 \times g. Pellets were frozen and thawed in 50 ml of lysis buffer (20 mM PIPES-KOH pH 6.6, 150 mM KCl, 0.1% Triton X-100, 10% glycerol, 1 mM MgCl₂, 1 mM EGTA, 0.1 mM DTT, 50 μ g/ml AEBSF, 5 μ g/ml aprotinin, 10 μ g/ml leupeptin, 2.5 μ g/ml pepstatin, and 10 μ g/ml E64. Cells were lysed by passing three times through a 23-gauge needle and cell debris were pelleted by centrifugation for 30 min at 4 °C and 30,000 \times g. Supernatant was diluted with one volume of Q-Sepharose-adjusting buffer (100 mM HEPES pH 8.0, 50 mM KCl, 0.9% Triton X-100, 1 mM EGTA, 1 mM MgCl₂, 0.1 mM DTT plus protease inhibitors and centrifuged at 100,000 \times g. The supernatant was loaded onto a 25 ml Q-Sepharose column equilibrated in Q buffer (100 mM HEPES-KOH pH 8.0, 100 mM KCl, 0.5% Triton X-100, 1 mM EGTA, 1 mM MgCl₂, 0.1 mM DTT). Flow through and 25 ml wash with Q buffer were collected, mixed with 1 volume of Ni-Sepharose adjustment buffer (60 mM imidazole pH 8.0, 900 mM KCl, 0.5%

Triton X-100, 20% sucrose, 1 mM MgCl₂, 1 mM EGTA, and protease inhibitors) and incubated at 4 °C for 90 min with 1 ml of Ni-Sepharose beads previously equilibrated in Ni column buffer (50 mM HEPES-KOH pH 8.0, 500 mM KCl, 0.5% Triton X-100, 10% sucrose, 50 mM Imidazole, 0.1 mM DTT). Beads were spun down at 100 \times g for 5 min at 4 °C, washed twice with Ni-column buffer, and packed in a disposable plastic column. The column was further washed with Ni-column buffer, equilibrated in equilibration buffer (50 mM HEPES-KOH pH 8.0, 250 mM KCl, 0.1 mM DTT, 50 mM imidazole), and the protein was eluted with equilibration buffer containing 250 mM imidazole. Purified His-tagged MAP6-F was extensively dialyzed against PEM buffer, aliquoted, frozen in liquid nitrogen, and stored at -80 °C. Protein purity was analyzed on Coomassie Blue-stained SDS-PAGE. Quantification was made with ImageJ and Excel softwares from scanned gel using bovine serum albumin as standard. For His-Mc domain purification, a 50 ml culture of infected High Five cells was spun down and frozen as indicated above. Cells were lysed in 10 ml of buffer (20 mM HEPES pH 7.4, 300 mM NaCl, 0.5% Triton X-100, and protease inhibitors), and centrifuged at 30,000 \times g for 30 min at 4 °C. The supernatant was heated at 90 °C for 15 min, cooled on ice, and centrifuged again. The supernatant was adjusted to 2.5 mM of imidazole and loaded on a 1 ml cobalt column (Pierce) connected to Duo Flow apparatus (Bio-Rad) pre-equilibrated in buffer A (20 mM HEPES pH 7.4, 300 mM NaCl, 2.5 mM imidazole). Column was washed with 20 ml of Buffer A and the proteins were eluted using a 2.5 to 200 mM imidazole gradient. Fractions with the Mc domain were pooled, concentrated with Ultracel-10K (Millipore), loaded on a S200 gel-filtration column equilibrated in 2 \times BRB buffer (160 mM PIPES pH 6.75, 2 mM EGTA, 2 mM MgCl₂). Elution fractions were analyzed, diluted with one volume of water, reconstituted with Ultracel-10K, aliquoted, frozen in liquid nitrogen, and stored at -80 °C. For circular dichroism experiments, the buffer containing the Mc domain was changed to 50 mM potassium phosphate buffer (pH 6.75) through repeated concentrations and dilution steps with Ultracel-10K.

In Vitro Analysis of the Mc Domain Binding to Taxol-stabilized Microtubules—Microtubules were polymerized from 50 μ M brain bovine PC-tubulin prepared as published (26). Tubulin was incubated for 20 min at 37 °C in PEM buffer (100 mM PIPES pH 6.75, 1 mM MgCl₂, 1 mM EGTA) supplemented with 1 mM of GTP. Mixture was further incubated at 37 °C for 10 min in the presence of Taxol (100 μ M) and then diluted to 2 μ M final concentration of tubulin. Five μ l of microtubule solution were incubated with 5 μ l of various concentrations of the Mc domain in PEM buffer plus 0.05% Tween 20 and 1 mM DTT. After 10 min at the indicated temperature, microtubules were sedimented through centrifugation at 100,000 \times g for 10 min at the incubation temperature. Pellets were recovered in 80 μ l of Laemmli buffer. Fifteen μ l of each fraction were loaded on a 12% SDS-PAGE gels. After migration, 2 gel bands were cut from each gel. The first at 45/60 kDa was Coomassie Blue stained to verify the even quantity of tubulin present in the assay. The second, at 30–45 kDa was transferred onto a single nitrocellulose membrane at 100 V for 1 h in transfer buffer containing 20% ethanol and 0.05% SDS. The Mc domain detection was

Microtubule Stabilization by MAP6

carried out as described for Western blot detection of MAP6-F except that pico-ECL kit (Pierce) was used, and the signal was recorded with Chemidoc apparatus (Bio-Rad). Signal intensities were quantified with ImageJ software, and the corresponding amount of protein present in the extract was determined by comparison with the ECL signal obtained with a ladder of given quantity of the protein using Excel software.

In Vitro Analysis of Microtubules Cold Stability—Microtubules were polymerized from 60 μM of bovin brain tubulin in PEM buffer plus 1 μM GTP at 37 °C for 30 min. Three μl of microtubule solution were mixed with 3 μl of PEM solution containing either 100 μM taxol or increasing concentration of purified MAP6-F or Mc domain and incubated on ice for 10 min. Five μl of the mix were loaded on 100 μl of a 30% sucrose cushion in PEM buffer, centrifuged at 100,000 $\times g$ for 30 min at 4 °C. The pellets were recovered in Laemmli buffer and analyzed by SDS-PAGE and Coomassie Blue staining.

Cryo-electron Microscopy Analysis of Microtubule Ends at 4 °C—Microtubules were grown from 80 μM of bovine brain tubulin in PEM-GTP buffer for 30 min at 37 °C. Microtubules were then diluted at 37 °C to 55 μM either with PEM buffer alone or supplemented with the Mc domain (5.5 μM final concentration). After 10 min at 37 °C, the mixes were incubated on ice for either 1 min in the control condition (rapid depolymerization) or for 20 min when microtubules were stabilized by the Mc domain. Five μl of chilled mixes were loaded onto holey carbon-coated grids, briefly blotted and plunged into liquid ethane using the vitrification robot Vitrabot MARK IV (FEI Co.). Specimens were observed with a Phillips CM200 using a Gatan G26 cryoholder. Images were recorded on Kodak SO163 films under low dose conditions at defocus in the range of 2 to 3 μm and at a magnification of $\times 27,500$. Micrographs were digitized with an Epson scanner at 1600 dpi.

Thermostability Analysis of MAP6-F—Forty μl of PEM buffer containing 1 μg of MAP6-F were either kept on ice or incubated for 30 min at 90 °C. Heated solutions were cooled down on ice and centrifuged at 100,000 $\times g$ for 15 min at 4 °C. Supernatants were recovered and mixed with 10 μl of 5× Laemmli buffer, while pellets were resuspended in 50 μl of Laemmli buffer. As control for the total amount of MAP6-F, 40 μl of non-centrifuged protein solution were treated as described for the supernatants. Protein solutions were analyzed by SDS-PAGE on 12% gel and Coomassie Blue staining.

Circular Dichroism Analysis—Circular dichroism spectra were recorded with a Jasco J-810 spectropolarimeter interfaced with a Peltier temperature control unit. The Mc domain concentration was 9 μM in 50 mM potassium phosphate buffer at pH 6.75. The path length of the cuvette was 1 mm. Thermal folding was followed by monitoring the CD signal at 220 nm and 208 nm while changing the temperature from 5 to 80 °C by 1 °C steps. The structural changes observed while varying the temperature was emphasized by subtracting the CD spectrum at 5 °C from the CD spectra obtained at given temperatures.

RESULTS

MAP6 Protects Microtubules against Temperature-dependent Depolymerization in Cells—Previous experiments have shown that in HeLa cells that do not express MAP6 proteins,

microtubules depolymerize when incubated on ice for a prolonged time (23). However, no data were available on the effect of moderate chilling conditions on microtubules. To assess the effect of intermediate drops in temperature on cellular microtubules, we incubated HeLa cells grown on coverslips at temperatures varying from 37 to 4 °C before rapid permeabilization and fixation (23). The remaining microtubules were observed and quantified (Fig. 1, A and B). The quantity of microtubules was constant for temperatures above 25 °C. This quantity then progressively decreased with lower temperatures to reach a very low level at 4 °C. Similar results were obtained with mouse embryonic fibroblasts derived from MAP6-null mice ($\text{MEF}^{-/-}$) (Fig. 1, A and C) albeit with stronger chilling effect on microtubules. In $\text{MEF}^{-/-}$, significant microtubule loss appeared below 25–20 °C with a rapid drop between 20 and 15 °C with only about 20% of microtubule left and a complete microtubule depolymerization below 10 °C (Fig. 1C).

On the contrary, in NIH/3T3 cells or MEF wild type ($\text{MEF}^{+/+}$) that express MAP6, microtubules were mostly resistant to cold-induced depolymerization (Fig. 1A). In NIH/3T3 cells, close to 80% of the total amount of microtubules was preserved at temperatures below 25 °C (Fig. 1B). In $\text{MEF}^{+/+}$, microtubule resistance to cold-induced depolymerization was not as strong as in NIH/3T3 cells, with 80% of remaining microtubules at 15 °C and 30% under 10 °C (Fig. 1C). This discrepancy between NIH/3T3 and $\text{MEF}^{+/+}$ could be correlated with the difference of MAP6-F expression as revealed by Western blot analysis (Fig. 1D).

We then analyzed the kinetics of cold-induced microtubule depolymerization in HeLa cells that do not express MAP6 proteins at 4 °C and 15 °C (Fig. 1E). At 4 °C, microtubules depolymerized rapidly and completely in 2 min. At 15 °C, microtubule amount dropped by about 40% in a few minutes but remained stable thereafter. This suggested that, in cells, a decrease in temperature induces a change from an equilibrium state at 37 °C to a new one with a lower quantity of microtubules. Altogether, these experiments indicated that below 25–20 °C, cellular microtubules depolymerize rapidly in a temperature-dependent manner unless they are protected by the presence of MAP6.

MAP6-F Binding and Stabilization of Microtubules under Cold Exposure Are Dynamic and Temperature-dependent—To better understand the mechanisms involved in microtubule stabilization by MAP6 upon chilling, we intended to correlate the cold conditions required for microtubule depolymerization to those required for MAP6 binding to and stabilization of microtubules.

It was shown that upon chilling, MAP6-F of NIH/3T3 cells re-localized from the cytoplasm to the microtubule network (16). Cold-dependent association of MAP6-F with microtubules was also observed in $\text{MEF}^{+/+}$ as revealed by immunofluorescence analysis (Fig. 2). Indeed, after cell permeabilization, MAP6-F was found associated with the microtubule network at 4 °C but not at 37 °C (*upper panels*). The low MAP6-F nuclear labeling visible at 37 °C correspond to background as observed in $\text{MEF}^{-/-}$ (*lower panels*). In addition, temperature-dependent translocation of mCherry-MAP6-F from the cytoplasm to microtubules in Hela cells was observed using live video

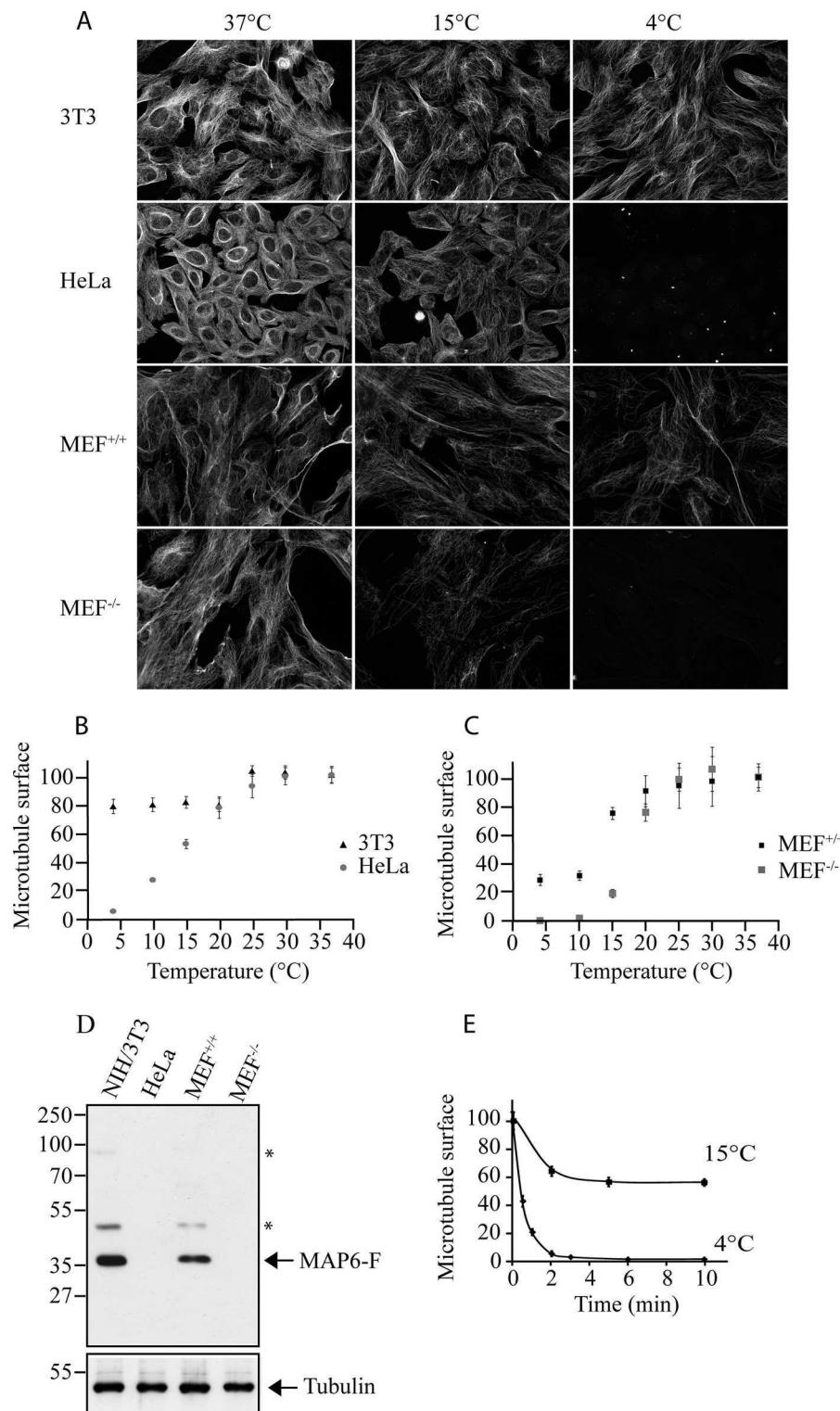


FIGURE 1. MAP6-F protects fibroblastic microtubules from temperature- and time-dependent cold-induced depolymerization. *A*, immunofluorescence analysis of microtubules of NIH/3T3 cells, HeLa cells, MEF^{+/+}, and MEF^{-/-} exposed to the indicated temperature. *B* and *C*, quantification of microtubule surface in immunofluorescence experiments as shown in *A* for each cell line (NIH/3T3 and HeLa in *B*, MEF^{+/+} and MEF^{-/-} in *C*). *D*, NIH/3T3, HeLa, MEF^{+/+} and MEF^{-/-} cell extracts were normalized for their content in tubulin and then analyzed for the expression of MAP6-F by Western blot. * indicates minor MAP6 isoforms (16, 19). *E*, quantification of microtubules remaining in HeLa cells after incubation for the indicated time at 4 or 15 °C. In *B*, *C*, and *E*, data represent mean \pm S.E. ($n \geq 12$) and are expressed as a percentage of the signal obtained without cold treatment (37 °C).

microscopy analysis (Fig. 3). Results revealed a progressive localization of the protein on microtubules during temperature shift from 37 to 15 °C.

To further characterize the association of MAP6 with microtubules, we performed cell fractionation and analyzed MAP6-F presence in soluble *versus* insoluble fractions. In par-

Microtubule Stabilization by MAP6

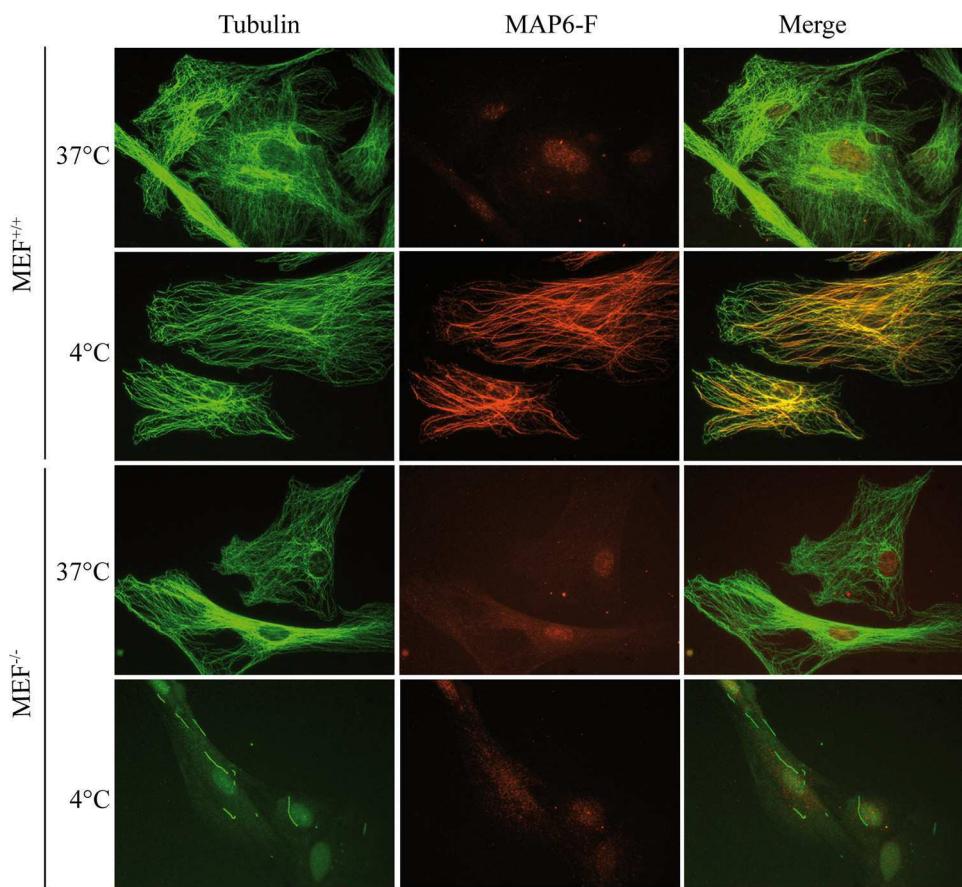


FIGURE 2. Cold-induced association of MAP6-F with the microtubule network in MEF. MEF^{+/+} or MEF^{-/-} were either kept at 37 °C or incubated at 4 °C for 30 min as indicated. Cells were then permeabilized with OPT at the incubation temperature, fixed, and processed for immunodetection of tubulin (green) or MAP6-F (red).

Downloaded from <http://www.jbc.org> by guest on May 5, 2016

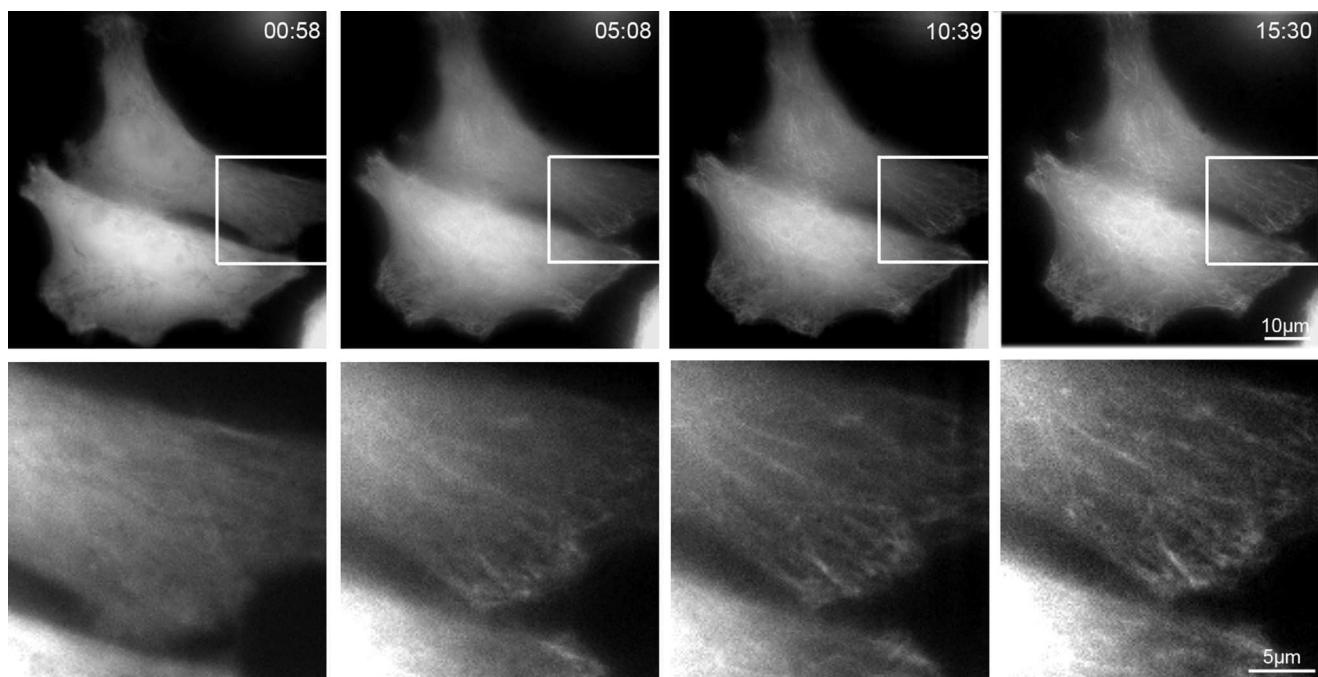


FIGURE 3. Cooling cells from 37 to 15 °C induces a progressive accumulation of MAP6-F-mCherry on microtubule network in HeLa cells. HeLa cells overexpressing MAP6-F fused to mCherry were placed in a perfusion chamber at 37 °C. Cell culture medium was progressively cooled from 37 to 15 °C during the course of the experiment (15 min:30 s). Upper panels are recorded images of MAP6-F-mCherry at the indicated time (min:s). Lower panels are enlargements (3×) of part of the images indicated by white squares.

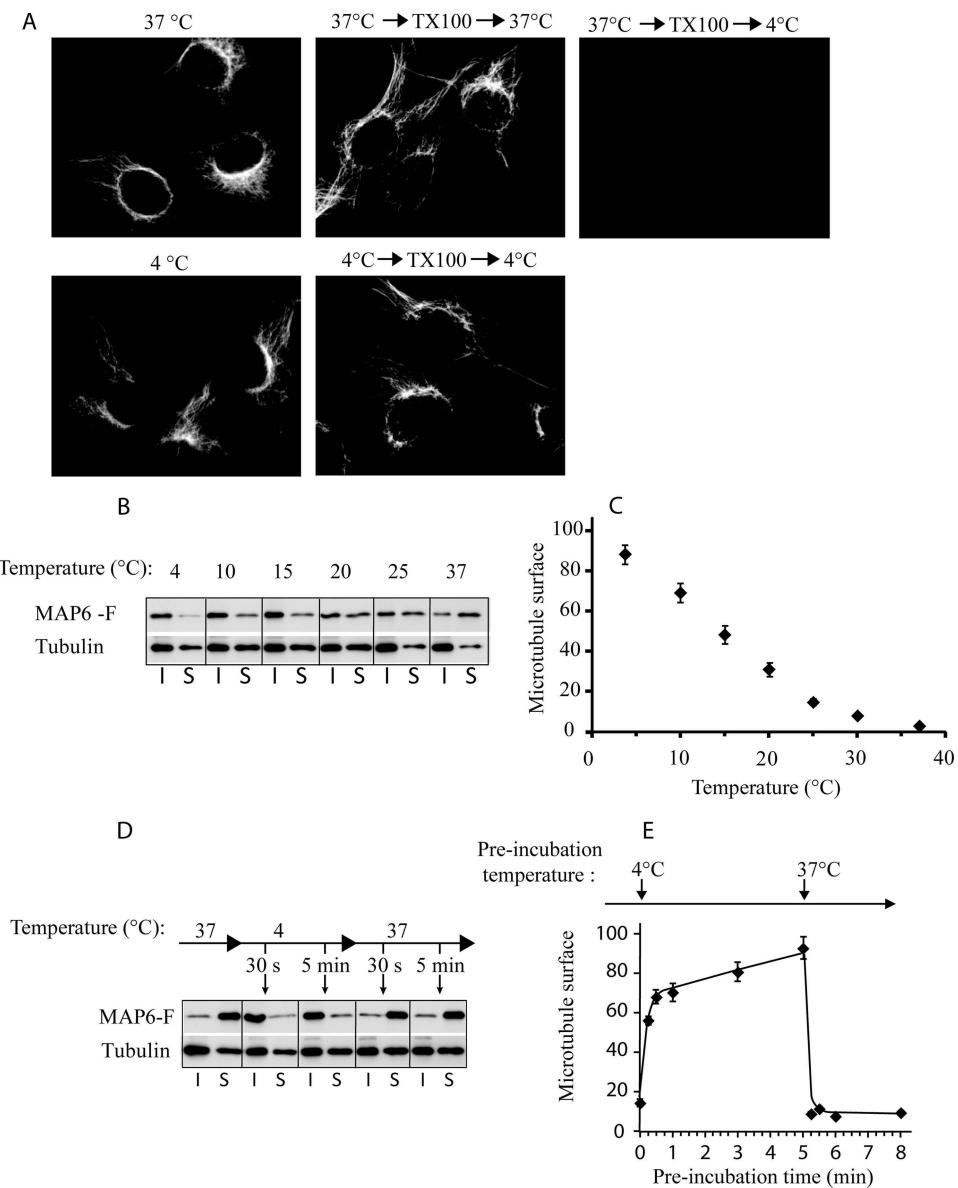


FIGURE 4. MAP6-F association with microtubules and stabilization of microtubules are fast and temperature-dependent. *A*, NIH/3T3 cells at 37 °C (upper lane) or incubated at 4 °C (lower lane), were permeabilized (TX100) and either directly fixed (left) or further incubated for 10 min at 37 °C (upper middle) or at 4 °C (upper and lower right) before microtubule immunodetection. *B*, Western blot analysis of MAP6-F present in soluble (S) or insoluble (I) fractions of NIH/3T3 cells exposed to the indicated temperature. *C*, quantification by immunofluorescence of the remaining microtubules in NIH/3T3 cells preincubated and permeabilized at the indicated temperature, and then further incubated at 4 °C. Data represent mean \pm S.E. ($n \geq 12$) and are expressed as a percentage of the signal obtained without cold treatment (37 °C). *D* and *E*, NIH/3T3 cells were treated as in *B* and *C*, respectively, except that the cell incubation and permeabilization temperatures were switched from 37 to 4 °C and then from 4 back to 37 °C. MAP6-F solubility (*D*) and subsequent microtubule cold stabilization at 4 °C (*E*) were analyzed at the indicated time course.

allel, we evaluated MAP6-F activity in NIH/3T3 cells by quantifying its microtubule cold-protecting effect. Indeed, since MAP6-F is not associated with the microtubules at 37 °C it is washed out upon cell permeabilization. Thus, when NIH/3T3 cells were incubated and permeabilized with a Triton X-100 containing buffer at 37 °C before cooling at 4 °C for additional 10 min, microtubules were not protected against cold and were lost (Fig. 4*A*, upper right panel). In contrast, when cells were first preincubated at 4 °C for 10 min to promote MAP6-F association with microtubules before permeabilization, microtubules stayed protected (Fig. 4*A*, lower right panel). The amount of remaining microtubules after preincubation of the cells under various temperature conditions before permeabilization

(at the same temperature) and subsequent incubation at 4 °C could then be quantified by immunodetection of tubulin. We thus analyzed under similar conditions the effect of pre-incubation temperatures varying from 4 to 37 °C on MAP6-F soluble/insoluble fractionation (Fig. 4*B*) and on microtubule cold stability (Fig. 4*C*). Results presented in Fig. 4*B* show a progressive increase in MAP6-F in the insoluble fraction and a decrease in the soluble fraction when the temperature decreased. Consistently, microtubule cold preservation increased progressively when the temperature decreased from 37 to 4 °C (Fig. 4*C*).

We next assessed in similar experiments, the kinetics of MAP6-F association with insoluble fraction and stabilization of

Microtubule Stabilization by MAP6

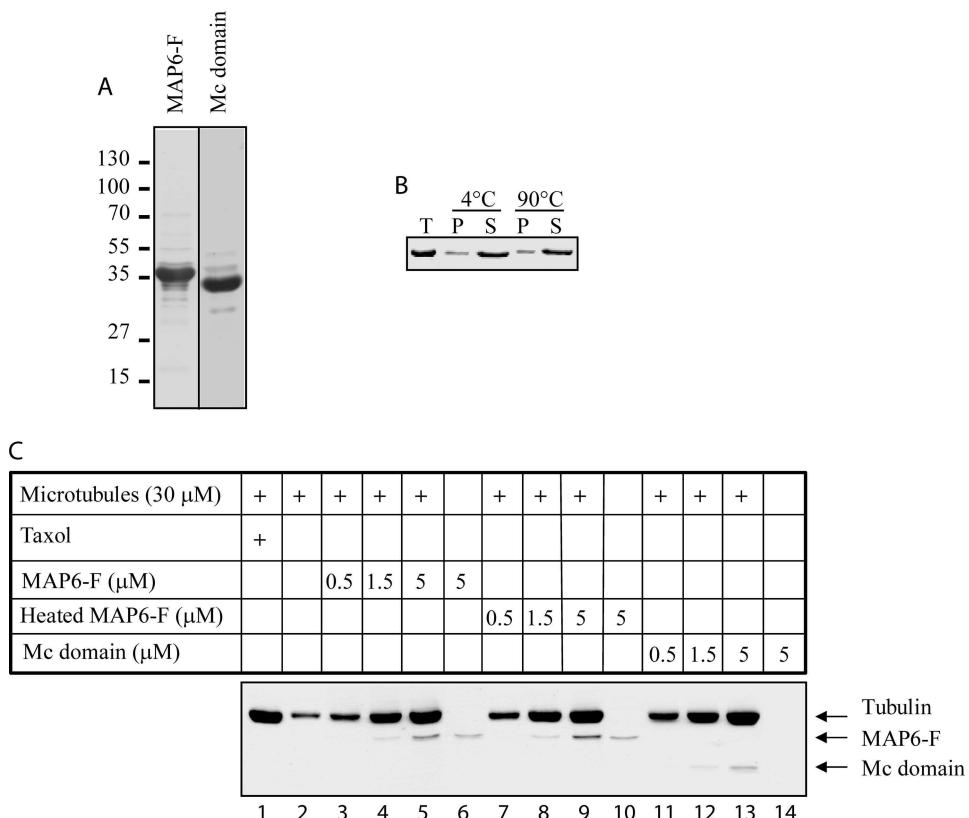


FIGURE 5. MAP6-F is a heat stable protein that stabilizes microtubules *in vitro* through interaction with its Mc domain. *A*, Coomassie Blue-stained SDS-PAGE gel of the purification products of MAP6-F and the Mc domain expressed as His-tagged proteins in insect cells. *B*, solubility analysis of purified MAP6-F at 4 °C or after heating for 30 min at 90 °C. Proteins in the 100,000 × g pellet (P) or supernatant (S) were analyzed in Coomassie Blue-stained SDS-PAGE gel. *T*: total. *C*, microtubule cold-stabilizing activity of MAP6-F, heated MAP6-F, and the Mc domain. Microtubules were grown from pure tubulin *in vitro*, mixed with either taxol (60 μM) or increasing concentration of MAP6-F, 90 °C-treated MAP6-F, or with the Mc repeat domain as indicated and then incubated on ice for 10 min. Cold-resistant microtubules were isolated by centrifugation, and the pellets were analyzed by SDS-PAGE and Coomassie Blue staining.

microtubules at 4 °C. As shown in Fig. 4*D*, an incubation at 4 °C as short as 30 s was sufficient for maximum MAP6-F association with the insoluble fraction and this association was reversible with apparently similar fast kinetics when cells were transferred back from 4 to 37 °C. As for the temperature-dependence experiment, induction of microtubule cold stabilization followed the localization of MAP6-F in the insoluble fraction (Fig. 4*E*). In addition, analysis of early time points showed that cold-induced stabilization of microtubules was mostly achieved within 15 s.

These results indicate that under cold exposure, MAP6-F interaction with microtubules is very fast and dynamic. This probably involves a direct effect of the temperature on one of the binding partners rather than a post-translational modification. Furthermore, the concomitant cold exposure conditions for microtubule depolymerization (Fig. 1) and MAP6-F association with microtubules (Fig. 4) suggested that microtubules and/or MAP6-F and/or other partners involved in the interaction might undergo temperature-dependent conformational changes.

MAP6-F Is a Heat-stable Protein That Protects Microtubules from Cold-induced Depolymerization through Direct Interaction via Its Mc Domain—To test whether MAP6-F by itself is capable of stabilizing microtubules and in which conditions, we carried out the purification of the MAP6-F protein as well as of its Mc domain that constitute two third of the molecule (189/

306 amino acids) and has been shown to specifically protect microtubules from cold when ectopically expressed in HeLa cells (22). Both polypeptides expressed in fusion with a His₆ tag using baculovirus-insect cells system were purified to purity close to 95% (Fig. 5*A*). During the course of the purification, we also observed that MAP6-F is a heat stable protein. Indeed, contrary to most proteins that denature and precipitate at temperatures above 50 °C, heating MAP6-F to 90 °C for 30 min did not lead to protein aggregation (Fig. 5*B*).

Using a microtubule sedimentation assay, we analyzed the capacity of purified MAP6-F to protect *in vitro* polymerized microtubules from cold-induced depolymerization. Fig. 5*C* shows that, as expected, microtubules grown at 37 °C were mostly lost when incubated at 4 °C alone (*lane 2*) as compared with the total amount of microtubules stabilized with taxol (*lane 1*). Addition of MAP6-F just before cooling at 4 °C protected microtubules from cold-induced depolymerization in a dose-dependent manner (*lanes 3–5*). The same held true when heated MAP6-F was used, confirming the heat stability of MAP6-F (*lanes 7–9*). The Mc domain was also used in this assay and presented the same ability as the full-length molecule for microtubule stabilization (*lanes 11–13*). It is interesting to note that the Mc domain was more soluble and did not sediment in the absence of microtubules (compare *lane 14* with *lanes 6* and *10*). Altogether, these results demonstrated for the first time that MAP6-F stabilizes microtubules exposed to cold via a

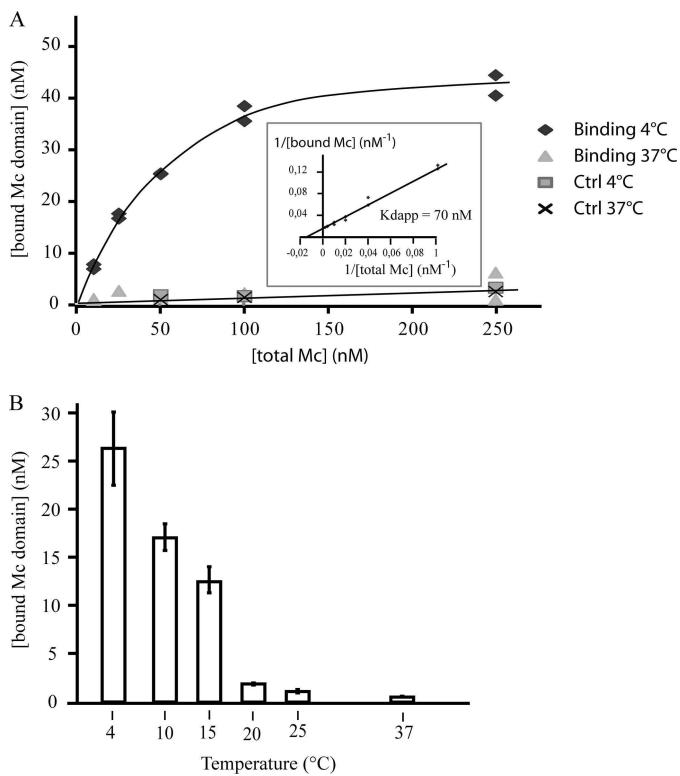


FIGURE 6. *In vitro* analysis of temperature-dependent binding of the MAP6 Mc domain with taxol-stabilized microtubules. *A*, microtubules were grown at 37 °C from 60 μ M pure tubulin, stabilized with Taxol and diluted to 1 μ M in the final binding reaction mix. The Mc domain was added at increasing concentrations and incubated at 4 or 37 °C for 10 min. Microtubules were isolated by centrifugation and the associated Mc domain was quantified by Western blot using Chemidoc apparatus, ImageJ, and Excel softwares. 4 and 37 °C controls (*Ctrl*) are the amount of the Mc domain pelleted in the absence of microtubules. *Inset*, Lineweaver-Burk plot analysis of the data shown in *A* gave 70 nM as the apparent dissociation constant (K_{dapp}) for the binding of the Mc domain to microtubules at 4 °C. *B*, the Mc domain (50 nM) binding to microtubules was analyzed as in *A* at the indicated temperatures. Data represent mean \pm S.E. ($n = 4$).

direct interaction. The Mc domain is able by itself to fully recapitulate this activity and is thus the main domain involved in this function.

Characterization of the Mc Domain Binding to Microtubules at 4 °C—To further characterize the effect of the temperature on MAP6-F interaction with microtubules, we performed a titration binding curve of the Mc domain to Taxol-stabilized microtubules. Results presented in Fig. 6*A* show that, at 4 °C, the Mc domain binding to 1 μ M of microtubules was titrable with a binding stoichiometry of 1 mol of the Mc domain for 25 mol of tubulin dimer. The apparent affinity determined was 70 nM. On the contrary, at 37 °C, no specific interaction was detected (Fig. 6*A*). Using a Mc domain concentration close to the apparent dissociation constant (K_d), we analyzed the effect of various temperatures on the Mc domain interaction with microtubules in the same conditions. Results presented in Fig. 6*B* show that, as for MAP6-F association with and stabilization of microtubule in NIH/3T3 cells (Fig. 4, *B* and *C*), *in vitro* microtubule binding of the Mc domain progressively increases with the fall of temperature. The interaction started to be detectable at 25 °C, rapidly increased between 20 °C and 15 °C and then was further strengthened between 15 °C and 4 °C.

Circular Dichroism Analysis of Temperature-dependent Conformational Changes in the Mc Domain—To investigate whether the temperature-associated changes in the binding affinity between the Mc domain and microtubules could be associated to conformational changes in the Mc domain, we carried out circular dichroism experiments (Fig. 7). Absorption spectra from 190 to 250 nm, obtained at different temperatures (Fig. 7*A*), indicated that the Mc domain was essentially unstructured with mainly random coiled signal (negative absorption peak near 195 nm) (27). Nevertheless, with increasing temperatures, the intensity of the negative bands at 198 nm decreased and shifted to slightly higher wavelengths while absorption at 219 nm appeared. Moreover, the presence of an isodichroic point at 208 nm indicated a two conformational state system. To characterize this structure, subtraction spectra were drawn (Fig. 7*B*). The difference spectra showed the apparition with heating of negative bands at 219 nm and positive bands at 195 nm. This signal is characteristic of beta structures (28). Temperature-dependent Mc domain absorption spectra at 220 nm (Fig. 7*A*, *inset*) indicated that the conformational change between 5 and 80 °C was linear and reversible. Altogether these data indicated that the Mc domain which contains beta structures progressively unfolded upon chilling from 37 to 5 °C.

Structural Analysis of Microtubules Stabilized at 4 °C by the Mc Domain—To gain insight into the mechanisms by which MAP6-F protects microtubules from depolymerization under cold exposure, we used cryo-electron microscopy to analyze microtubules at 4 °C in the absence or in the presence of the Mc domain. Growing and shrinking microtubules assume various conformations at their extremities, including sheet-like extensions and blunt ends during polymerization and outwardly curled protofilaments in disassembling conditions (29, 30). As MAP6-F inhibits cold-induced microtubule disassembly, we wondered whether it could affect the global structure of microtubule ends. Microtubules were polymerized at 37 °C and then incubated at 4 °C with or without the Mc domain. In our conditions, we could not observe the Mc domain bound to the stabilized microtubules. The main observed differences concerned the structures of the microtubule ends that presented mostly curled depolymerizing protofilaments in the absence of the Mc domain and about 50% of blunt extremities in the presence of the Mc domain (Fig. 8). These data indicated that the Mc domain stabilized the extremities of microtubule exposed to cold. However, one would have expected a near to complete stabilization of microtubules without curled ends in the presence of the Mc domain. The remaining 50% of curled microtubule ends indicates that the microtubule stabilization is not complete and that the Mc domain might only dramatically slow down depolymerization and/or allow very slow dynamics at low temperatures.

DISCUSSION

MAP6 proteins have been shown to be essential for the stabilization of microtubules in cells at 4 °C. In fibroblastic cells, the main isoform, MAP6-F, was shown to relocalize from the cytoplasm to the microtubule network upon chilling to 4 °C. It has been suggested that the changes in MAP6-F binding to microtubules relied on temperature-induced changes in

Microtubule Stabilization by MAP6

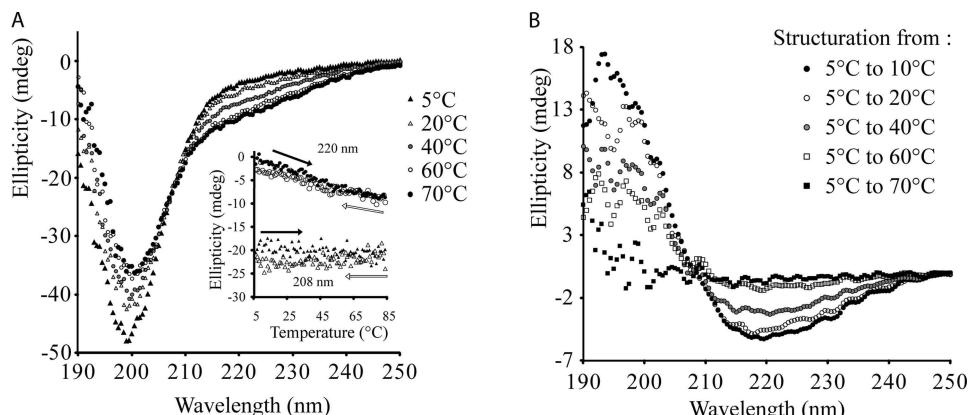


FIGURE 7. Temperature induces secondary structure changes in the Mc domain of MAP6. *A*, circular dichroism spectra at 5 °C showed a clear minimum for the spectrum at 198 nm, indicating a mostly random coiled structure. This minimum is shifted with increasing temperature toward higher wavelengths and a minimum at 219 nm appears. This indicates an increase in structuration. In the inset, the structuration has been monitored at 220 nm from 5 to 85 °C as indicated by the black arrow. The folding reversibility from 85 °C to 5 °C is indicated by the open arrow. The isodichroic point at 208 nm suggests a two-state system characterizing the secondary structure of the Mc domain. *B*, difference CD spectra from *A*. The subtraction of the CD spectrum at 5 °C from CD spectra at 10, 20, 40, and 70 °C gave the structure gain during the temperature titration. The spectra obtained correspond to β -sheet conformation.

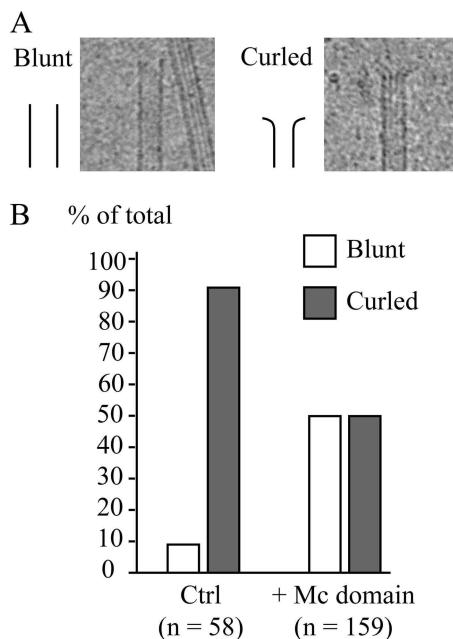


FIGURE 8. Microtubule cold-stabilization by the Mc domain is associated with an increase of blunt-ended microtubules. Microtubules were grown from 80 μ M of pure tubulin at 37 °C, mixed at a final concentration of 55 μ M with buffer alone (Ctrl) or with 5.5 μ M final of the Mc domain (Mc). After 10 min at 37 °C, microtubules were chilled on ice for 1 min to allow partial depolymerization of microtubules alone or for 20 min for the Mc domain-stabilized microtubules. Microtubules were loaded on grids, frozen in liquid ethane, and observed by cryo-electron microscopy. *A*, pictures and schematic representations of microtubule curled and blunt ends. *B*, quantitative analysis of the proportion of blunt versus curled ends in control condition or in the presence of the Mc domain.

MAP6-F post-translational modifications (16). We show here that under cold exposure, MAP6-F recruitment to microtubules and stabilization is highly dynamic, indicating a direct effect of the temperature on the interaction. *In vitro*, purified MAP6-F can directly interact with and stabilize microtubules against cold-induced depolymerization through its Mc domain. As observed *in vivo* for MAP6-F, *in vitro* binding of the Mc domain to microtubules is temperature-dependent. The binding was very low at 37 °C and increased significantly when the

temperature decreased below 20 °C to reach a high affinity ($K_{dapp} = 70$ nm) at 4 °C. Thus, *in vivo* and *in vitro*, the Mc domain of MAP6 recognizes and stabilizes microtubules as soon as the temperature drops under 20 °C.

What Is the Structural Element that Regulates the Interaction between Microtubules and the Mc Domain of MAP6?—Our results reveal that lowering of temperature is accompanied by the recruitment of MAP6-F on microtubules both in cells and *in vitro*. This suggests that MAP6-F adopts a cold-dependent conformation enabling its interaction with the polymers, and/or that MAP6-F recognizes a structural feature of microtubules depolymerizing under cold exposure. Our data provide strong evidence that variations in temperatures induce conformational changes of MAP6-F. MAP6-F exhibits beta structures at 37 °C and progressively unfolds as the temperature decreases, enabling its interaction with microtubules and their subsequent stabilization. MAP6-F binding to microtubules at low temperatures could also involve the recognition of a specific feature of cold-induced depolymerizing polymers. In particular, shrinking microtubules display curled protofilaments at their ends, but we did not observe any accumulation of MAP6-F at the extremity of disassembling microtubules, neither in cells (Figs. 2 and 3) nor in purified assays (Fig. 8), suggesting that specific recognition of the outwardly curled protofilaments by MAP6-F is an unlikely mechanism. MAP6-F might associate preferentially to a cold-sensitive lattice region, although little information is available on changes occurring at low temperatures within the microtubule wall. High-resolution structures of MAP6-F and MAP6-F/microtubule complexes will be required to visualize the Mc domain and its precise binding sites to the microtubule lattice.

How Does the Mc Domain of MAP6 Stabilize Microtubules at 4 °C?—As suggested above, under cold exposure, the Mc domain of MAP6 might bridge adjacent protofilaments. This, in turn, would decrease the catastrophe frequency thought to be involved in cold-induced microtubule depolymerization (9). Reinforcing lateral interactions has already been proposed to be a way of stabilizing microtubules in cold-living organisms (12). Such a mechanism is reminiscent of the doublecortin microtu-

bule stabilization mode at 37 °C (31). Doublecortin is an anti-catastrophe factor that stabilizes microtubules by linking adjacent protofilaments and counteracting their outward bending in depolymerizing microtubules (32). The analysis of the Mc domain effects on microtubule dynamics at low temperature should be very informative but such experiments which require a controlled cold environment are still technically challenging.

A Link Between the Mc Domain Structure and MAP6 Aggregation in Human Pathology?—During our *in vitro* studies we discovered that MAP6-F is a weakly structured molecule as revealed by its heat stability, a feature shared by other MAPs such as MAP1, MAP2, and Tau (33). The folding of MAP6-F into beta structures represents a peculiar behavior already reported for the Tau protein (34). These beta structures have been implicated in the formation of pathologic amyloid aggregates (35) and beta structures of MAP6 might be implicated in the aggregation of MAP6 in Lewis bodies during amyotrophic lateral sclerosis (36).

A Physiological Function for MAP6 Stabilization of Microtubules under Cold Exposure?—In HeLa cells, that do not express MAP6 proteins, microtubules depolymerized in a temperature-dependent manner as soon as the temperature decreased below 20 °C with virtually no microtubules left at 4 °C. On the contrary, in MAP6-containing NIH/3T3 cells, 80% of microtubules were preserved upon cold exposure from 20 to 4 °C. In more physiological conditions, MAP6 of MEF^{+/+} allowed to preserve about 80% of microtubules at 15 °C and 30% at temperatures below 10 °C. In animals, such low temperatures could be achieved during episodes of torpor or hibernation and MAP6 could be required to preserve a minimal level of microtubules in such challenging conditions. In this study we considered the whole Mc domain without analyzing the contribution of each individual repeat. However, one can speculate that the composition in repeats of the Mc domain would determine the strength of the cold response. Along this line, we found a relatively good correlation between the number of repeats (from 1 to 9) in the Mc domain of mammals and the ability of the animals to hibernate or to make torpor. For example, almost all genome-sequenced rodents (house mice, Norway rat, thirteen-lined ground squirrel) which exhibit MAP6 with 3 to 9 Mc repeats are able to hibernate/torpor, whereas the naked mole rat which exhibits only one repeat is very sensitive to cold exposure (main cause of lethality).

Also, in primates, only the lemurian branch which contains several Mc repeats (3 to 6 for small-eared galago and gray mouse lemur) can enter torpor whereas all other primates including human, Sumatran orangutan, chimpanzee, gorilla, Rhesus monkey, and Hamadryas baboon do not enter torpor and express MAP6 containing only one repeat. In human, MAP6 stabilization of microtubules can still be useful during accidental hypothermic episodes or even during perioperative hypothermia following anesthesia.

In conclusion, the Mc domain of MAP6 behaves as a sensor of temperature able to protect microtubules from temperature variations. How microtubule stabilization upon temperature reduction is involved and whether it is crucial to adapt cold-dependent cell responses such as metabolic changes are exciting questions.

Acknowledgments—We thank D. Job for helpful discussions on the work and to L. Aubry, J. Brocard, F. Costagliola, and J.C. Deloulme for critical reading of the manuscript. We are grateful to the Institute of Structural Biology Jean-Pierre Ebel (Grenoble, France) for the use of its EM facility.

REFERENCES

- 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
- Howard, J., and Hyman, A. A. (2009) Growth, fluctuation and switching at microtubule plus ends. *Nat. Rev. Mol. Cell Biol.* **10**, 569–574
- Nogales, E., and Wang, H. W. (2006) Structural intermediates in microtubule assembly and disassembly: how and why? *Curr. Opin. Cell Biol.* **18**, 179–184
- Wade, R. H. (2009) On and around microtubules: an overview. *Mol. Biotechnol.* **43**, 177–191
- Lee, J. C., and Timasheff, S. N. (1977) *In vitro* reconstitution of calf brain microtubules: effects of solution variables. *Biochemistry* **16**, 1754–1764
- Olmsted, J. B., and Borisy, G. G. (1975) Ionic and nucleotide requirements for microtubule polymerization *in vitro*. *Biochemistry* **14**, 2996–3005
- Regula, C. S., Pfeiffer, J. R., and Berlin, R. D. (1981) Microtubule assembly and disassembly at alkaline pH. *J. Cell Biol.* **89**, 45–53
- Schilstra, M. J., Bayley, P. M., and Martin, S. R. (1991) The effect of solution composition on microtubule dynamic instability. *Biochem. J.* **277**, 839–847
- Fygenson, D. K., Braun, E., and Libchaber, A. (1994) Phase diagram of microtubules. *Phys. Rev. E. Stat. Phys. Plasmas Fluids Relat. Interdiscip. Topics* **50**, 1579–1588
- Modig, C., Wallin, M., and Olsson, P. E. (2000) Expression of cold-adapted β -tubulins confer cold-tolerance to human cellular microtubules. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* **269**, 787–791
- Detrich, H. W., 3rd. (1997) Microtubule assembly in cold-adapted organisms: functional properties and structural adaptations of tubulins from antarctic fishes. *Comp. Biochem. Physiol. A. Physiol.* **118**, 501–513
- Detrich, H. W., 3rd, Parker, S. K., Williams, R. C., Jr., Nogales, E., and Downing, K. H. (2000) Cold adaptation of microtubule assembly and dynamics. Structural interpretation of primary sequence changes present in the α - and β -tubulins of Antarctic fishes. *J. Biol. Chem.* **275**, 37038–37047
- Geiser, F. (1988) Reduction of metabolism during hibernation and daily torpor in mammals and birds: temperature effect or physiological inhibition? *J. Comp. Physiol. B.* **158**, 25–37
- Heldmaier, G., Ortmann, S., and Elvert, R. (2004) Natural hypometabolism during hibernation and daily torpor in mammals. *Respir. Physiol. Neurobiol.* **141**, 317–329
- Andrieux, A., Salin, P. A., Vernet, M., Kujala, P., Baratier, J., Gory-Fauré, S., Bosc, C., Pointu, H., Projeto, D., Schweitzer, A., Denarier, E., Klumperman, J., and Job, D. (2002) The suppression of brain cold-stable microtubules in mice induces synaptic defects associated with neuroleptic-sensitive behavioral disorders. *Genes Dev.* **16**, 2350–2364
- Denarier, E., Fourest-Lievin, A., Bosc, C., Pirollet, F., Chapel, A., Margolis, R. L., and Job, D. (1998) Nonneuronal isoforms of STOP protein are responsible for microtubule cold stability in mammalian fibroblasts. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* **95**, 6055–6060
- Bosc, C., Andrieux, A., and Job, D. (2003) STOP proteins. *Biochemistry* **42**, 12125–12132
- Aguezzoul, M., Andrieux, A., and Denarier, E. (2003) Overlap of promoter and coding sequences in the mouse STOP gene (Mtap6). *Genomics* **81**, 623–627
- Galiano, M. R., Bosc, C., Schweitzer, A., Andrieux, A., Job, D., and Hallak, M. E. (2004) Astrocytes and oligodendrocytes express different STOP protein isoforms. *J. Neurosci. Res.* **78**, 329–337
- Guillaud, L., Bosc, C., Fourest-Lievin, A., Denarier, E., Pirollet, F., Lafanachère, 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

Microtubule Stabilization by MAP6

21. Ochoa, C. D., Stevens, T., and Balczon, R. (2011) Cold exposure reveals two populations of microtubules in pulmonary endothelia. *Am. J. Physiol. Lung Cell Mol. Physiol.* **300**, L132–L138
22. Bosc, C., Frank, R., Denarier, E., Ronjat, M., Schweitzer, A., Wehland, J., and Job, D. (2001) Identification of novel bifunctional calmodulin-binding and microtubule-stabilizing motifs in STOP proteins. *J. Biol. Chem.* **276**, 30904–30913
23. Lievin, A., Labbé, J. C., Dorée, M., and Job, D. (1994) Intrinsic microtubule stability in interphase cells. *J. Cell Biol.* **124**, 985–996
24. Erck, C., Peris, L., Andrieux, A., Meissirel, C., Gruber, A. D., Vernet, M., Schweitzer, A., Saoudi, Y., Pointu, H., Bosc, C., Salin, P. A., Job, D., and Wehland, J. (2005) A vital role of tubulin-tyrosine-ligase for neuronal organization. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* **102**, 7853–7858
25. Schneider, C. A., Rasband, W. S., and Eliceiri, K. W. (2012) NIH Image to ImageJ: 25 years of image analysis. *Nat. Methods* **9**, 671–675
26. Paturle-Lafanechère, L., Eddé, B., Denoulet, P., Van Dorsselaer, A., Mazarguil, H., Le Caer, J. P., Wehland, J., and Job, D. (1991) Characterization of a major brain tubulin variant which cannot be tyrosinated. *Biochemistry* **30**, 10523–10528
27. Venyaminov, S. Y., Baikalov, I. A., Shen, Z. M., Wu, C. S., and Yang, J. T. (1993) Circular dichroic analysis of denatured proteins: inclusion of denatured proteins in the reference set. *Anal. Biochem.* **214**, 17–24
28. Greenfield, N., and Fasman, G. D. (1969) Computed circular dichroism spectra for the evaluation of protein conformation. *Biochemistry* **8**, 4108–4116
29. 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
30. 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
31. Moores, C. A., Perderiset, M., Francis, F., Chelly, J., Houdusse, A., and Milligan, R. A. (2004) Mechanism of microtubule stabilization by doublecortin. *Mol. Cell* **14**, 833–839
32. Moores, C. A., Perderiset, M., Kappeler, C., Kain, S., Drummond, D., Perkins, S. J., Chelly, J., Cross, R., Houdusse, A., and Francis, F. (2006) Distinct roles of doublecortin modulating the microtubule cytoskeleton. *EMBO J.* **25**, 4448–4457
33. Vera, J. C., Rivas, C. I., and Maccioni, R. B. (1988) Heat-stable microtubule protein MAP-1 binds to microtubules and induces microtubule assembly. *FEBS Lett.* **232**, 159–162
34. 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
35. 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
36. Letourneau, F., Bocquet, A., Dubas, F., Barthelaix, A., and Eyer, J. (2003) Stable tubule only polypeptides (STOP) proteins co-aggregate with spheroid neurofilaments in amyotrophic lateral sclerosis. *J. Neuropathol. Exp. Neurol.* **62**, 1211–1219

**MAP6-F Is a Temperature Sensor That Directly Binds to and Protects
Microtubules from Cold-induced Depolymerization**

Christian Delphin, Denis Bouvier, Maxime Seggio, Emilie Couriol, Yasmina Saoudi,
Eric Denarier, Christophe Bosc, Odile Valiron, Mariano Bisbal, Isabelle Arnal and
Annie Andrieux

J. Biol. Chem. 2012, 287:35127-35138.
doi: 10.1074/jbc.M112.398339 originally published online August 17, 2012

Access the most updated version of this article at doi: [10.1074/jbc.M112.398339](https://doi.org/10.1074/jbc.M112.398339)

Alerts:

- [When this article is cited](#)
- [When a correction for this article is posted](#)

[Click here](#) to choose from all of JBC's e-mail alerts

This article cites 36 references, 15 of which can be accessed free at
<http://www.jbc.org/content/287/42/35127.full.html#ref-list-1>

Article 2

Résumé de l'article "**Regulation of Microtubule dynamics at both microtubule (+) and (-) end by MAP6**" by Seggio et al.

Les microtubules jouent un rôle important dans le maintien de l'architecture spatiale des neurones, dans leur croissance mais également dans le trafic axonal qui sous tend la neuro-transmission dans le système nerveux. Les microtubules vont en effet avoir un rôle essentiel dans le transport de vésicules et de neurotransmetteurs d'un bout à l'autre du neurone. La protéine MAP6 est une MAP essentiellement neuronale connue pour son effet de stabilisation des microtubules au froid. Des études au sein du laboratoire ont également mis en évidence un rôle de la protéine MAP6 sur les microtubules à 37°C dans les cellules. Cependant, les effets de la protéine sur la dynamique des microtubules n'avaient, jusqu'à présent, jamais été étudiés. L'objectif de cette étude a été d'analyser *in vitro* l'effet de la protéine MAP6 recombinante sur différents paramètres microtubulaires. Ainsi nos travaux ont permis de visualiser en temps réel la dynamique des microtubules et de caractériser les effets de la protéine MAP6 sur la dynamique des microtubules puis dans un second temps grâce à l'utilisation de diverses formes tronquées de MAP6 de déterminer les différents domaines de la protéine impliqués dans les effets observés.

Nous avons ainsi montré que la protéine MAP6-N était capable :

- d'interagir de façon directe avec les microtubules à 37°C
- d'induire la nucléation des microtubules sous la concentration critique de tubuline libre
- de stabiliser les bouts (+) des microtubules en diminuant la fréquence de catastrophe, en permettant l'apparition de sauvetage, d'induire une augmentation de la vitesse de polymérisation de cette extrémité
- de diminuer très fortement la proportion de bout (-) dynamique (croissance figée)

Grace à l'utilisation de plusieurs fragments de MAP6-N nous avons pu montrer que :

- les domaines de liaison aux microtubules Mn1 et Mn2 sont importants pour la stabilisation des bouts (+) ainsi que pour l'augmentation de la vitesse de polymérisation des microtubules
- le domaine de liaison aux microtubules Mn 3 est crucial pour la réduction de la vitesse de dépolymérisation des bouts (+) permettant la facilitation d'apparition d'événements de sauvetage mais il est aussi responsable de la perte de dynamicité des bouts (-) des microtubules.

En résumé la protéine MAP6 régule la dynamique des microtubules aux bouts (+) comme le font les autres MAPs structurales (tau, MAP2) mais MAP6 se comporte aussi comme un (-) TIPs, bloquant les bouts (-) des microtubules comme le font les protéines de la famille CAMSAP. **Cette dualité d'action de MAP6 aux deux extrémités des MTs** n'a jamais été rapportée pour une autre protéine.

Regulation of microtubule dynamics at both microtubules (+) and (-) ends by the Microtubule-Associated Protein 6 (MAP6)

Maxime Seggio^{1,2,3}, Christophe Bosc^{1,2}, Annie Andrieux^{1,2,3} and Christian Delphin^{1,2}

¹INSERM, U1216, F-38000 Grenoble, France

²Univ. Grenoble Alpes, Grenoble Institut Neurosciences, F-38000 Grenoble, France

³CEA, BIG, F-38000 Grenoble, France

Correspondence: Annie.Andrieux@univ-grenoble-alpes.fr or Christian.Delphin@univ-grenoble-alpes.fr

Abstract

Microtubules formed by tubulin dimers have dynamic properties important for many functions in cells and their dynamicity is tightly regulated by many factors and proteins. Among them, are the structural Microtubule Associated Proteins (MAPs) which include MAP1, MAP2, Tau and MAP6 (also known as STOP), all able to bind and stabilize microtubules. MAP6 have the peculiar ability to stabilize microtubules against cold exposure. The structural MAPs and especially MAP6 have been shown to be involved in synaptic plasticity events and thereby important for integrated brain functions. MAP6 has been shown to protect microtubules from cold and nocodazole exposure, but MAP6 effects on microtubule dynamics still need to be determined. Here, thanks to the production of MAP6 recombinant proteins and using biochemical techniques coupled to videomicroscopy, we analyzed the effects of MAP6-N, the longest MAP6 isoform, on microtubule behavior *in vitro*. We demonstrated that MAP6-N promotes microtubule nucleation. Concerning microtubule dynamics, we found that MAP6 regulates microtubule (+) ends by stimulating microtubule elongation, with an increased growth rate and a decrease of depolymerization occurrence, speed and duration. Using MAP6 deletion fragments we determined that the effects on microtubule (+) ends dynamics are driven by the microtubule binding domains Mn1 and Mn2. Finally and interestingly we also found that MAP6-N, through its microtubule binding domain Mn3, strongly regulates the microtubule (-) ends dynamics with a complete blockade of this extremity.

Altogether our results demonstrate a unique feature of MAP6 in enhancing microtubule (+) ends growth while inhibiting microtubule (-) ends dynamics.

Introduction

Microtubules are components of the eukaryotic cell cytoskeleton, playing important roles in cell division and migration, in the intracellular trafficking and in the structure maintenance of the cells. Microtubules result from the polymerization of tubulin dimers and are extremely dynamic structures which undergo growing and shrinking phases possibly ending by catastrophe and rescue events respectively. These processes defined as “dynamic instability” (Mitchison and Kirschner, 1984) have been shown to be tightly regulated by a large number of Microtubule Associated Proteins (MAPs) including microtubule + ends proteins such as CLIP170 and EB1 or structural MAPs such as Tau, MAP1 or MAP2.

In addition to their involvement in the regulation of microtubule dynamic, the structural MAPs have also the abilities to stabilize cellular microtubules against depolymerising conditions such as nocodazole exposure (Goedert et al., 1991; Takemura et al., 1992). In vitro, microtubules are also very sensitive to cold and readily depolymerize at 4°C. However, in most cells and especially in neurons, microtubules are cold stable.

In this context, in the 80's, the search of MAPs able to sustain microtubule cold resistance in neurons has led to the identification of MAP6 proteins (also known as STOP). Indeed MAP6 purified from brain-stable microtubules was shown to protect exogenous microtubules to cold exposure (Job et al., 1987; Margolis et al., 1986a; Margolis et al., 1986b; Margolis et al., 1990). In mammals, MAP6 is a family of proteins that results from mRNA splicing and alternative promoter use of a single gene (*map6*) (Aguezzoul et al., 2003; Denarier et al., 1998a).

The neuronal and largest MAP6 isoform, MAP6-N, harbors two types of microtubules binding domains: the Mc and Mn modules which exhibit no homology with microtubule binding domains found in other structural MAPs. MAP6-N contains two consecutive Mn modules in its N-terminal part (Mn1 and Mn2) and an additional one isolated in the middle of its sequence (Mn3). The Mc modules are clustered in the central domain as four to six highly conserved repetitions organized in tandem in rodents and only one Mc module in human. It is worth noting that the number and the organization of Mn and Mc modules can be different among the MAP6 isoforms, and this may lead to functional variations toward the propensity of MAP6 proteins to stabilize MTs (Bosc et al., 1996; Bosc et al., 2001; Denarier et al., 1998b; Guillaud et al., 1998).

At biochemical level, the Mn modules allow MAP6 to protect MTs against cold- and nocodazole-induced depolymerization while the Mc modules permit MAP6 to stabilize MTs in cold conditions. Actually, Mc modules interact with microtubule only at 4°C not at 37°C due to their shrinking ability to change conformation with the temperature (Delphin et al., 2012).

The physiological roles of MAP6 proteins are not yet fully understood, but phenotypic and cellular analyses of MAP6 null mice indicated that MAP6 proteins are involved in a number of neuronal functions. MAP6 KO mice present defects in neuronal connectivity, synaptic plasticity and neurotransmission associated with severe behavioral disorders (Andrieux et al., 2002; Bouvrais-Veret et al., 2007; Bouvrais-Veret et al., 2008; Brenner et al., 2007; Brun et al., 2005; Fournet et al., 2012b). Interestingly, long-term neuroleptic treatment alleviated some of these defects (Andrieux et al., 2002; Begou et al., 2008; Delotterie et al., 2010), suggesting that MAP6 KO mice may represent a valuable animal model for the study of psychiatric diseases especially schizophrenia. In line with these findings, genetic studies have pointed out a possible link between MAP6 and schizophrenia (Shimizu et al., 2006) and MAP6 has been found to be mis-regulated in human samples from patients suffering from psychiatric diseases (Choi et al., 2009; Martins-de-Souza et al., 2009; Wei et al., 2016). Interestingly, treatment of MAP6 deficient mice by microtubule related drugs such as epothilone D or davunetide alleviated some behavioral and biological defects (Andrieux et al., 2006; Daoust et al., 2014; Fournet et al., 2012a; Merenlender-Wagner et al., 2010). These results suggest that some of the neuronal defects reminiscent of schizophrenia observed in MAP6 KO mice may, in part, be due to altered cytoskeletal regulations due to the absence of MAP6 proteins. However, MAP6 proteins have also been reported to bind to actin (Baratier et al., 2006), to re-locate at the synapses following phosphorylation by CamKII, to be associated with membranous compartment (Gory-Faure et al., 2006; Gory-Faure et al., 2014) and to be associated to receptors complexes where they can act as signaling proteins through Proline rich domains (PRD) (Deloulme et al., 2015). In this context, in order to better understand the implication of microtubule mis-regulation in the neuronal defects observed in MAP6 KO animals, the basic properties of MAP6 toward microtubules needed to be determined, especially on microtubule dynamics.

Here, thanks to recombinant MAP6 proteins and using biochemistry techniques coupled to TIRF microscopy we have performed a comprehensive study of MAP6-N behavior toward microtubules, at physiological temperature. We found that MAP6-N protein interacts with microtubules all along the lattice, allows microtubule stabilization and increases the growth rate at microtubule (+) ends. Using different MAP6 fragments, we demonstrated that the Mn1 and Mn2 domains are responsible of the growth-rate increase. Interestingly, we found that MAP6-N interacts with microtubule (-) ends and induce a rapid and complete freezing of this extremity. This stabilization of the microtubule (-) ends is dependant of the Mn3 domain of MAP6.

Materials and Methods

Preparation of Tubulin.

Tubulin was purified from bovine brain and labelled with ATTO-565 (ATTO-TEC GmbH, Germany) (Hyman et al., 1991).

Recombinant proteins expression.

For His-MAP6-N expression, full length MAP6-N (amino acids 1 to 952) was cloned in pFastBac-Htb. For expression of His-MAP6-N-GFP-His, His-MAP6-N(90-177)-GFP-His, His-MAP6-N(90-221+492-614)-GFP-His, and His-MAP6-N(615-952)-GFP-His, the corresponding MAP6-N sequences were cloned into pFastBac-Htb in fusion with an additional GFP and histidine-Tag at the C-termini. Recombinant bacmids were produced by transforming DH10BAC bacteria cells with the constructs and allowed to obtain baculovirus through transformation of SF9 insect cells using Fugen HD (ThermoFischer). For expression of recombinant proteins, High 5 cells in suspension at 2.10^6 cells/ml were infected with baculovirus, harvested after 48h of incubation at 27°C and stored at -80°C.

Purification of His-MAP6-N.

Each 10^8 high5 cells pellet was resuspended in 5mL of lysis buffer (50 mM Hepes pH7,4; 400 mM NaCl; 1 mM EGTA; 1mM EDTA; 0,5% Triton X-100; 1 protease inhibitor tablet mini (Roche)) and centrifuged at 150,000g for 30 min at 4°C. The soluble fraction was diluted 4 times with the dilution buffer (50 mM Hepes pH7,4 ; 0,5% Triton X-100 ; 1 mM EGTA; 1 mM EDTA) and centrifuged again at 150,000g for 30 min at 4°C. The supernatant was passed through a 4 mL Q-sepharose column and loaded on a 5 mL SP-sepharose column. After washing with Q/SP column buffer (50 mM Hepes pH7,4 ; 100 mM NaCl ; 0,05% Triton X-100) bound proteins were eluted with 5 column volumes of elution buffer (50 mM Hepes pH7,4 ; 400 mM NaCl ; 0,05% Triton X-100). Heated-stable proteins present in solution were recovered in the supernatant after incubation at 90°C for 20 min and centrifugation (250,000g for 30 min at 4°C). Imidazole (6 mM) was then added, and the solution was loaded on a cobalt column (1 mL; Fisher Scientific). The cobalt column was washed with 50 mM Hepes pH7,4 ; 400 mM NaCl; 10 mM imidazole. Bound proteins were then eluted by rising the imidazole concentration up to 200 mM in the same buffer. The eluate was next dialysed (Slide-A-Lyzer dialysis cassette, (Thermo Fisher Scientific) in BRB80 buffer (80 mM Pipes pH6,9; 1 mM EGTA; 1 mM MgCl₂) aliquoted, frozen in liquid nitrogen and stored at -80°C.

Purification of His-MAP6-N-GFP-His.

Each 10^8 high5 cells pellet was resuspended in 5mL of Lysis buffer A (50 mM Hepes pH7,4 ; 500 mM Arginine ; 1 mM EGTA; 1mM EDTA ; 1 protease inhibitor tablet mini (Roche)). After centrifugation (150,000g, 30 min, 4°C), the supernatant was diluted 10 times in dilution buffer (50

mM Hepes pH7,4 ; 100 mM NaCl ; 0,1% Triton X-100 ; 1 mM EGTA; 1mM EDTA) and centrifuged again at 150,000g for 30 min at 4°C. The supernatant was passed through a 4 mL Q-sepharose column and loaded on a 5 mL SP-sepharose column. After washing with Q/SP column buffer (50 mM Hepes pH7,4 ; 150 mM NaCl ; 0,05% Triton X-100) bound proteins where eluted with 5 column volumes of elution buffer (50 mM Hepes pH7,4 ; 400 mM NaCl ; 0,05% Triton X-100). Imidazole (6 mM) was then added, and the solution was loaded on a cobalt column (1 mL; Fisher Scientific). The cobalt column was first washed with 50 mM Hepes pH7,4 ; 400 mM NaCl; in the presence of 20 mM of imidazole and the bound proteins where further eluted in the presence of 200 mM of imidazole. The eluate was next dialysed against BRB80 buffer, aliquoted, frozen in liquid nitrogen and stored at -80°C.

Purification of His-MAP6-N(90-177)-GFP-His, His-MAP6-N(90-221+492-614)-GFP-His and His-MAP6-N(615-952)-GFP-His

Each 10^8 high5 cells pellet was resuspended in 5mL of Lysis buffer C containing 50 mM Hepes pH7,4 ; 500 mM Arginine ; 1 protease inhibitor tablet mini (Roche). The solution was centrifuged at 150,000 g at 4°C for 30 min and the supernatant was diluted 10 times in dilution buffer (50 mM Hepes pH7,4 ; 100 mM NaCl ; 0,2% Triton X-100) and centrifuged at 150,000xg at 4°C for 30 min. The supernatant was passed through a 4 mL Q-sepharose column. Its NaCl concentration was adjusted to 400 mM and imidazole (6 mM) was added before loading on a cobalt column (1 mL). The cobalt column was washed with 20 mM of imidazole and the proteins eluted with 200 mM of imidazole in 50 mM Hepes pH7,4 ; 400 mM NaCl. The eluate was next dialysed against BRB80 buffer, aliquoted, frozen in liquid nitrogen and stored at -80°C.

Analysis of microtubules nucleation by turbidimetry

Tubulin nucleation and polymerization was followed by turbidity at 390 nm. 80 μ L polymerization reactions containing tubulin (15 μ M) with or without MAP6-N or TAU as indicated in BRB80 buffer (80 mM Pipes ; 1 mM EGTA ; 1 mM MgCl₂ pH6,75) supplemented with 1 mM GTP were mixed on ice and transferred to prewarmed 37°C cuvette chamber. The absorption was recorded every 30 s for 100 min.

Microtubules nucleation Analysis by pellet assay

For microtubule pellet assays, tubulin (20 μ M) was incubated during 1 hour at 37°C with 1mM GTP in BRB80 buffer in the absence or in the presence of 1 μ M or 1,5 μ M of MAP6-N and centrifuged for 15 min at 100,000g. Proteins present in the pellets (microtubules) and supernatants (free tubulin) were analyzed by SDS-PAGE and Coomassie-blue staining.

For video-microscopy studies, microtubule nucleation was directly observed by DIC (Differential Interference Contrast) and TIRF (Total Internal Reflection Fluorescence) microscopy. In DIC videomicroscopy, 20 µM of tubulin free polymerized in addition of 1mM GTP in BRB80 buffer at 37°C with or without 1 µM of MAP6-N protein. Samples were visualized on an (inverted caractérisitque DIC). In TIRF video microscopy, 10 µM of tubulin free polymerized in BRB80 buffer with 1mM GTP at 37°C with or without 400 nM of MAP6-N protein.

TIRF microscopy analysis of microtubule polymerization

Microtubule seeds preparation - Microtubule seeds were obtained by polymerizing 10 µM of tubulin (50% of biotinylated tubulin and 50% of ATTO-565 labeled tubulin) in the presence of 1 mM GMPCPP in BRB80 buffer at 37°C for 1h. Microtubule seeds were then centrifuged for 5 min at 100,000g, resuspended in an equal volume of BRB80 with 1 mM of GMPCPP aliquoted and stored in liquid nitrogen.

Perfusion chamber preparation - Slides and coverslips were first sonicated in acetone during 30 min, successively washed in acetone (30 min) and ethanol 99% (15 min) and rinsed with ultrapure water. Slides and coverslips were next treated with a solution of 2% hellmanex (Hellma) during 2-3 hours and washed with H₂O. They were next sonicated (4 x 5 min) in 1 M KOH, rinsed with water, dried and incubated overnight at room temperature under gentle agitation in a 1 mg/mL solution of PEG-silane (30kDa, creative PEG-work) for slides or PEG-silane-biotin (3,5 kDa, LaysanBio) for coverslips in ethanol and 0,02% HCl. Slides and coverslips were next washed in ethanol 99% and ultrapure water, dried and stored at 4°C. Perfusion chambers were assembled between slides and coverslips using double adhesive tape face to form a 15 µL flow chamber.

Microtubule polymerization assay - The flow chamber was successively incubated at room temperature with 25 µg/mL of neutravidin (Pierce) in BRB80 plus 1% BSA for 5 min, 0,1 mg/mL of PLL-PEG 2 kDa (Jenkem) in 10 mM Hepes pH 7.4, washed three times with BSA 1% in BRB80 buffer, incubated for 10 min in a 1/1000 dilution of microtubule seeds in BRB80 and washed with BSA 1% in BRB80 buffer. Microtubule polymerization was observed with 10 µM of tubulin (30% of ATTO-565 labeled tubulin and 70% unlabelled tubulin) in TIRF buffer (BRB80 buffer plus 1 mM GTP, 50 mM KCl, 4 mM DTT, 0.1% BSA, 1 mg/mL glucose, 70 µg/mL catalase, 600 µg/mL glucose oxidase, and 0,05% methylcellulose (4,000 centipoise)). Samples were visualized on an inverted microscope (Eclipse Ti, Nikon) equipped with an ilas TIRF system (Roper Scientific), a cooled charged-coupled device camera (EMCCD Evolve 512, Photometrics) with 512 × 512-pixel imaging array (16 × 16 µm pixels), a warm stage controller (LINKAM MC60), and controlled by MetaMorph software (version 7.7.5, Molecular Devices). Samples were excited with 491 nm

561nm lasers and observed using an Apochromat 60X oil immersion objective (NA 1.49). Time-lapse imaging was performed at 1 frame per 5 s with a 100 ms exposure time during 1 hour.

Microtubule polymerization assay in DIC microscopy

Slides and coverslips were successively washed in acetone and in pure ethanol before being rinsed with ultra pure water and dried. Perfusion chambers were assembled between slides and coverslips using double adhesive tape face to form a 20 µL flow chamber. The flow chamber was successively rinsed with BRB80 buffer, incubated with axonemes in BRB80 buffer during 5min, rinsed with BRB80 buffer plus 1% casein and finally BRB80 buffer. Microtubules polymerization was initiated with 30 µM of tubulin in BRB80 buffer plus 1 mM GTP with or without 1 µM of MAP6-N. Buffer-exchanges during polymerization were performed by perfusing 60 µl of indicated pre-warmed solution.

Analysis of microtubule dynamic parameters

Image analysis was performed using Image J software. The four parameters determining the microtubule dynamics were determined on kymographs using an in-house plug-in. Growth and shrinkage rates were calculated from the kymograph slopes corresponding to the microtubules growing and shrinking phases. Catastrophe frequencies were obtained by dividing the number of events per microtubules by the time spent in growing state. Rescue frequencies were obtained by dividing the number of rescue events by the number of catastrophe.

MAP6-N interaction with taxol-stabilized microtubules

Microtubules were polymerized from 70 µM tubulin in BRB Buffer plus 1 mM GTP for 30 min at 35°C. Taxol 100 µM was then added and the incubation continued for additional 15 min. The polymerization mix was diluted to 15µM tubulin and centrifuged at 200,000g for 10 min at 35°C. Microtubules were resuspended in a volume of binding buffer (BRB80 plus 50 mM KCl, 5 mM DTT, 0.05% Tween 20) and their concentration quantified using a tubulin concentration ladder and analysis of the scanned Coomassie-blue stained SDS-PAGE gels with Image J software. Microtubules (200nM) were incubated with increasing concentration of MAP6-N-GFP (5 to 500nM in triplicates) for 10 min at 35 °C in 10 µL of binding buffer and centrifuged at 200,000g for 10 min at 35°C. The supernatants were discarded and the pellet resuspended with 200 µl of 100 mM Tris-HCl pH8, 3 M urea and the quantities of MAP6-N-GFP co-sedimented with tubulin were quantified against a MAP6-N-GFP calibration curve using PHERAstar^{FS} (BMG Labtech).

MAP6-N interaction with tubulin dimers

Tubulin (500 µg) was incubated with 100 µL of CNBR-activated Sepharose beads (Thermo Fisher Scientific) in 600 µL of coupling buffer (100 mM NaHCO₃ pH8.3, 200 mM NaCl, 1 mM EGTA, 1 mM MgCl₂) for 1 h at room temperature. The beads were then washed with and incubated in

blocking buffer (100 mM Tris-HCl pH8) for 2 h. The beads (10 μ l) were rinsed with interaction buffer (BRB80 plus 50 mM KCl and 0.05% tween 20) and incubated with 2 μ g of His-MAP6-N in 100 μ L of interaction buffer for 30 min. The soluble fractions were recovered; the beads were washed 3 times with incubation buffer and resuspended in laemmli buffer for western blot analysis using 23N/23C rabbit anti-MAP6 antibodies.

Results

MAP6-N protein when over expressed in HeLa cells co-localized with microtubules and stabilized them from nocodazole exposure at physiological temperature (Bosc et al., 1996; Bosc et al., 2001). However, the ultimate experiments showing the binding of purified MAP6 proteins to microtubules was still missing. We thus produced MAP6 proteins especially the longest isoform MAP6-N, using baculovirus system and purified them to homogeneity (Figure 1A and S1).

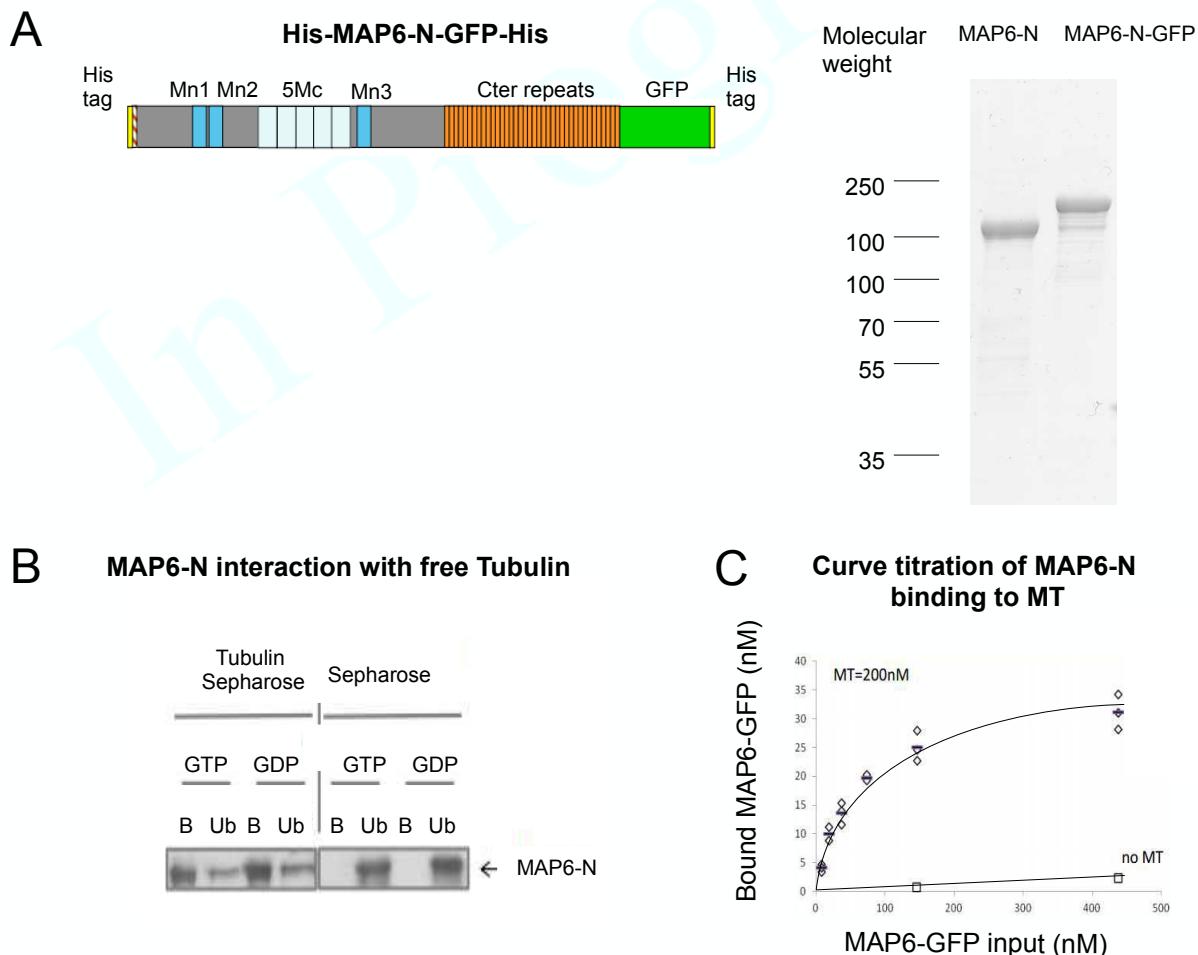


Figure 1 : MAP6 interaction with tubulin and microtubules

- (A) Representation of the His-MAP6-N-GFP-His protein. Mc domains allow microtubule interaction at cold temperature. Mn domains allow microtubule interaction at physiological temperature. Coomassie gel showing purified His-MAP6-N-GFP-His and His-MAP6-N protein.
- (B) MAP6-N interaction with free tubulin dimers. MAP6-N (200nM) was incubated with Sepharose beads uncoated or coated with tubulin. Amount of MAP6-N bound to the beads (B) or unbound (Ub) was analyzed by western blot.
- (C) Titration curve of MAP6-N interaction with microtubules. Taxol-stabilized microtubules (200 nM) were incubated with increasing amounts of His-MAP6-N-GFP-His (5 to 450 nM). After sedimentation, GFP fluorescence associated with microtubules was quantified and the amount of MAP6-N bound to microtubule was plotted.

MAP6-N directly interacts with microtubules and free tubulin

Using tubulin coupled to sepharose beads, we showed that MAP6-N was able to interact with tubulin dimers (Figure 1B). To analyze the ability of MAP6-N to bind to microtubules we carried out co-sedimentation assays of MAP6-N-GFP with taxol-stabilized microtubules. As shown in Figure 1C, MAP6-N binds to microtubules in a saturable manner with an apparent Kd of 57 nM. In these conditions, the stoichiometry of the interaction is around 1 molecule of MAP6 protein for 6-7 tubulin dimers.

MAP6-N promotes microtubule nucleation

Microtubule nucleation is an unfavorable and slow process which is facilitated *in vivo* by γ -tubulin containing complexes. *In vitro*, the spontaneous nucleation of microtubule occurs only when the concentration of tubulin is above a critical concentration (25-30 μ M in our conditions). Some structural MAPs such as Tau, MAP1 and MAP2 have been shown to allow microtubule nucleation *in vitro* at tubulin concentration lower than the critical concentration. We thus assayed whether MAP6-N could also induce the nucleation of microtubules. Indeed, we observed in a turbidity assay that addition of 1 μ M of MAP6-N to 15 μ M of tubulin in BRB buffer containing 1mM GTP, allows the nucleation and growth of microtubules that would not otherwise occur (Figure 2A). MAP6N effect on microtubule nucleation was similar to this of Tau used at the same concentration. Induction of microtubule nucleation by MAP6-N was also observed in a sedimentation assay where microtubules were found in the pellet fraction only in the presence of MAP6-N (1 and 1.5 μ M) (Figure 2B).

Microtubule nucleation triggered by MAP6-N was then visualized using two techniques of real-time videomicroscopy, the DIC (Differential Interference Contrast) and TIRF (Total Internal Reflection Fluorescence) microscopy. In absence of MAP6-N no microtubule was observable whereas in the presence of MAP6-N microtubules were formed and increased in size over time (Figure 2C).

*MAP6-N stabilizes microtubules *in vitro**

When transfected in cells, MAP6-N was able to prevent microtubule depolymerisation, we wish to evaluate this parameter in a cell-free system. Thus, microtubules were polymerized from 20 μ M of tubulin using axonemes as nucleation centers and observed in DIC microscopy (Figure 3A, left columns). As expected, depleting tubulin from the polymerization mix by perfusion resulted in a rapid and complete microtubule depolymerization leaving only the axonemes visible after 5 minutes (Figure 3A, top right panel). On the contrary, the presence of MAP6-N (1 μ M) in the perfusion mix, allowed the stabilization of microtubules in the absence of free tubulin for more than 50 minutes.

Similar results were obtained when MAP6-N was added during the polymerization step rather than during the tubulin depletion step (bottom right panel).

These results showed that MAP6-N is able to bind to polymerizing and/or to polymerized microtubules and able to protect them from the dilution-induced depolymerization.

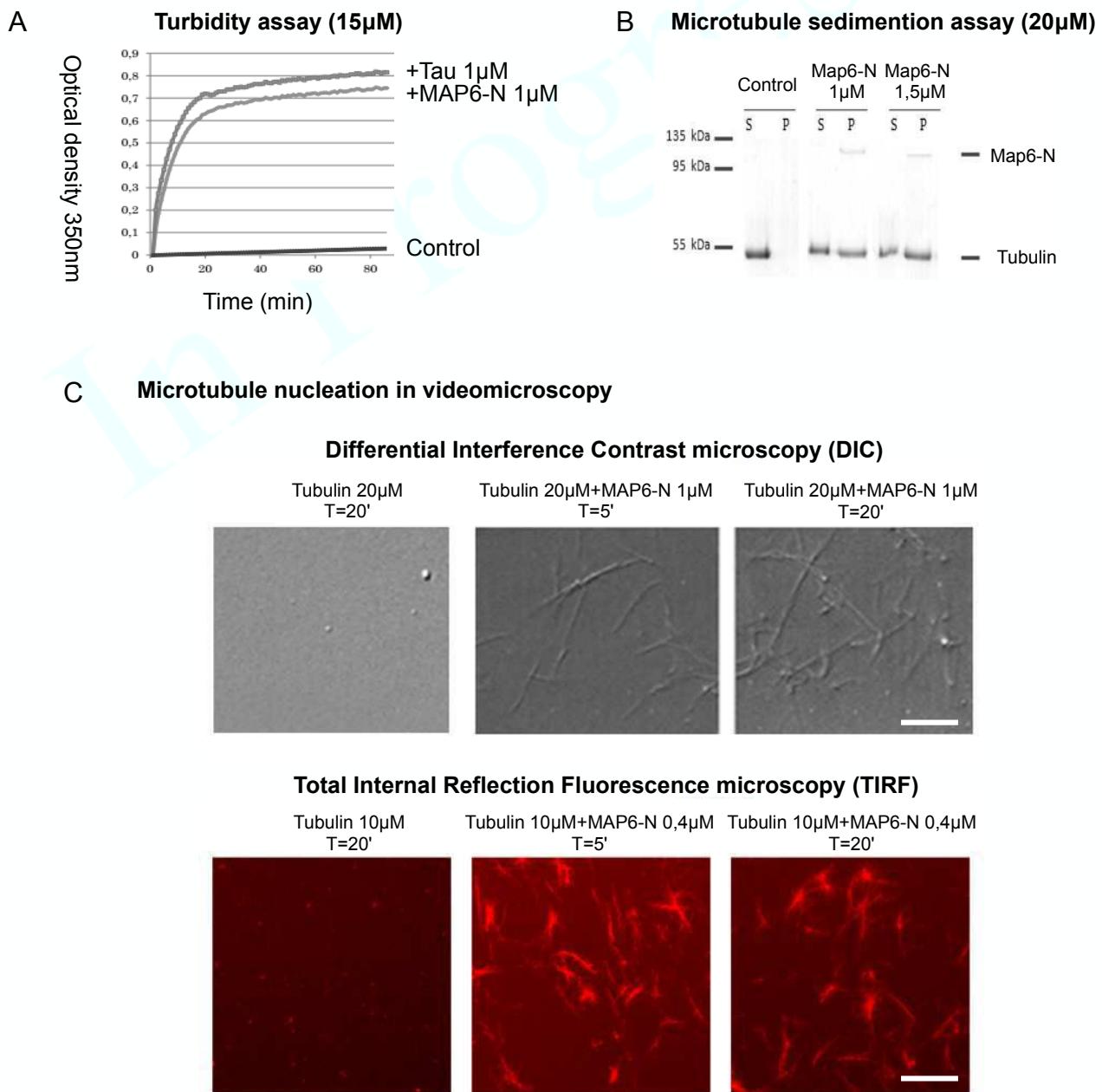


Figure 2 : MAP6-N and microtubule nucleation

(A-C) MAP6-N protein was able to nucleate microtubules. (A) Turbidity assay with 15 μ M of free tubulin at 350 nm wavelength. Without MAP6-N no microtubule nucleation was observed (control). With 1 μ M of MAP6-N or tau, microtubule nucleation occurred. (B) Pellet assay with free tubulin (20 μ M) with or without MAP6-N incubated for 1 hour. Supernatants (S) and pellets (P) were analyzed. Tubulin can be observed in pellets in the presence of MAP6-N indicating the presence of microtubules, without MAP6-N, tubulin did not polymerize and remained in the supernatant. (C) Microtubule nucleation directly observed by video-microscopy using DIC microscopy (top panel) and TIRF microscopy with tubulin labeled in red (bottom panel). Free tubulin was incubated with MAP6-N as indicated and pictures were taken after 5 and 20 minutes. Scale bar 15 μ m.

Effect of MAP6-N on microtubule dynamic parameters

Microtubules are highly dynamic polymers which undergo polymerisation and depolymerisation phases. The transition between the polymerization and depolymerization phase is called a catastrophe and the opposite event a rescue. Catastrophe frequency is calculated by the number of catastrophe divided by the time of microtubule growth. The rescue frequency is calculated by the number of rescue divided by the number of catastrophes. Growth and shrinkage rates, catastrophe and rescue frequencies define the dynamics of microtubules. Several studies had shown *in vitro* that the structural MAPs Tau, MAP1 and MAP2 are able to influence the microtubule dynamics and we wondered whether it is also the case for MAP6-N.

We analyzed, using TIRF microscopy, the *in vitro* polymerization of microtubules from microtubule seeds stabilized with GMPCPP (a non hydrolysable analog of GTP) and 10 μ M of tubulin (Figure 3 B-C). Kymographs showing microtubule behavior were generated in control conditions or in the presence of 40 nM of MAP6-N as illustrated in Figure 3C. The different parameters of microtubules dynamics were then obtained from the kymographs (Figure 3B). The merge of the two kymographs corresponding to tubulin in the presence of MAP6-N showed a direct interaction of MAP6 with the microtubule during polymerization but also with the microtubule seed already polymerized (Figure 3B).

In control conditions, microtubule (+) ends were extremely dynamic with a growth of approximately 0.46 ± 0.05 μ m/min, a depolymerisation speed of 20.9 ± 4.27 μ m/min, a catastrophe frequency of 0,25 event/minute and no rescue events observable (Figure 3B-C). In the presence of MAP6-N, the microtubule (+) ends growth rate was increased by approximately 50% (1.21 ± 0.19 μ m/min as compared to 0.76 ± 0.05 μ m/min for control conditions) and the depolymerization speed reduced by 50% (10.06 ± 3.7 μ m/min as compared to 20.1 ± 4.97 μ m/min for control conditions). Moreover, microtubule (+) ends were highly stable with very little events of shrinkage and almost a total rescue of the shrinkage events (frequency of rescue = 96%; Figure 3C). These results suggest that MAP6-N regulate microtubule (+) ends dynamics with an overall stabilizing effect.

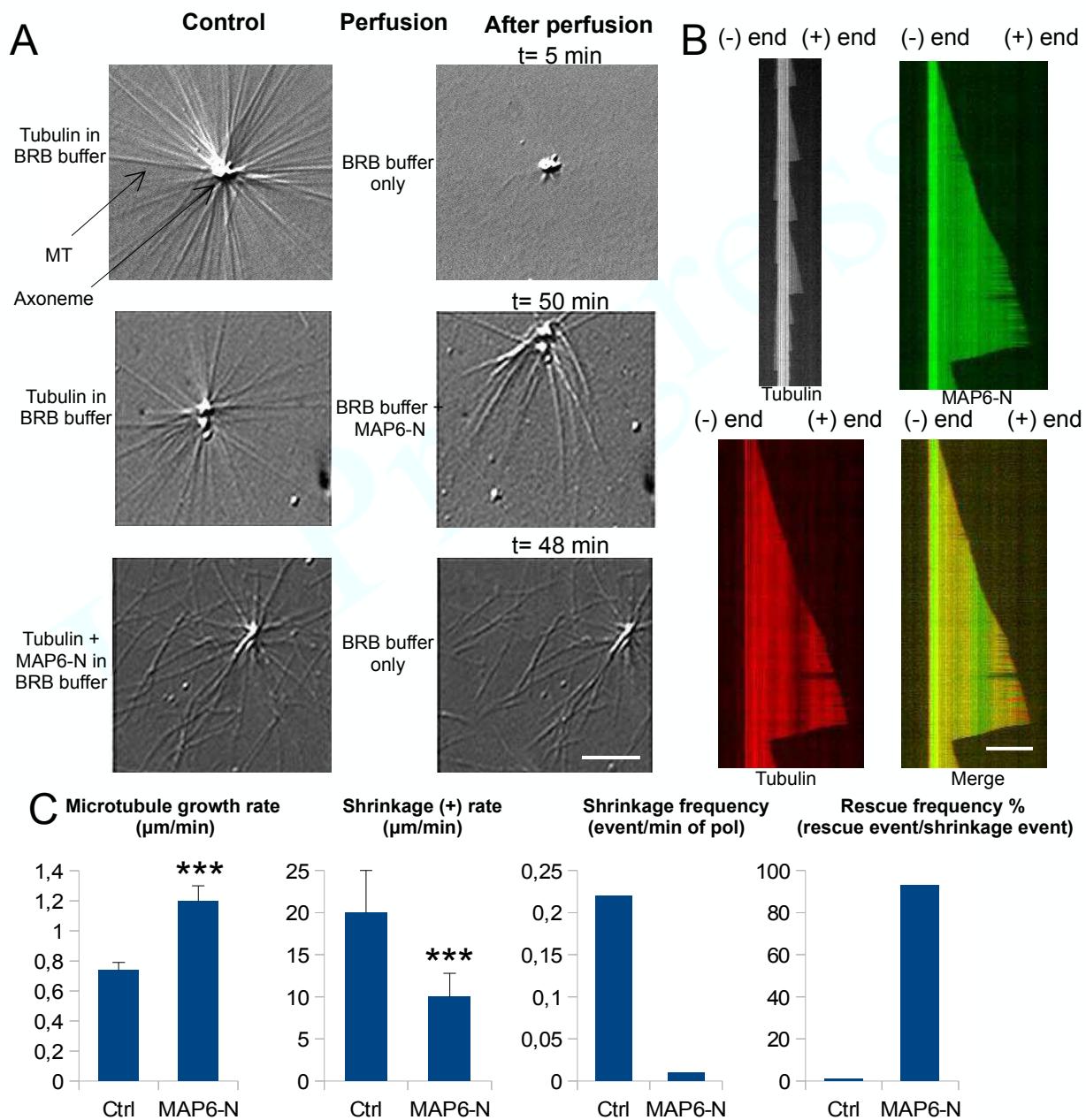


Figure 3 : MAP6-N effect on the microtubule stability and microtubule (+) ends dynamic

(A) Effect of MAP6-N on microtubule stability. Images of microtubules polymerized from axonemes in BRB buffer, observed by DIC microscopy before (left columns) and after perfusion to induce microtubule depolymerization (right columns). Top lanes correspond to experiments where microtubules were formed without MAP6-N and perfused with BRB buffer; a clear microtubules depolymerisation was observed. Middle lanes correspond to experiments where microtubules were formed without MAP6-N and perfused with BRB buffer containing MAP6-N (1 μM); a clear stabilization of microtubules was observed. Bottom lanes correspond to experiments where microtubules were formed in the presence of MAP6-N and perfused with BRB buffer; a clear stabilization of microtubules was observed. Scale bar 15 μm .

(B-C) Effect of MAP6-N on microtubule dynamic. Tubulin (10 μM) was incubated with MAP6-N (40 nM) in the presence of microtubule seeds and the behavior of microtubules was monitored by TIRF microscopy. (B) Kymograph representing the microtubule behavior with and without MAP6-N. Scale bar 20 μm . (C) Quantification of microtubule dynamic parameters: growth rate, shrinkage rate, shrinkage frequency (event/minute of polymerization) and rescue frequency (rescue event/shrinkage event). Growth rates were $0.76 \pm 0.05 \mu\text{m}/\text{min}$ ($n=320$ min) and $1.21 \pm 0.19 \mu\text{m}/\text{min}$ ($n=583$ min) without and with MAP6-N, respectively. Shrinkage rate rates were $20.1 \pm 4.97 \mu\text{m}/\text{min}$ ($n=21$ min) and $10.06 \pm 3.7 \mu\text{m}/\text{min}$ ($n=29$ min) without and with MAP6-N, respectively. Catastrophe frequencies were 0.22 and 0.02 event/min of polymerization without and with MAP6-N, respectively. Rescue frequencies were 0.73% and 96% (event/shrinkage event) without and with MAP6-N, respectively.

Statistical significance were obtained using t test, *** $p < 0.1\%$.

Implication of MAP6 microtubules binding domains on microtubule (+) ends dynamics parameters

In order to better understand the domains of MAP6 involved in the regulation of microtubule (+) ends dynamics we engineered several MAP6 fragments. Recombinant MAP6 fragments (Figure S3) were expressed using baculovirus system and purified. The MAP6(90-177) construct mainly correspond to the 2 microtubules Mn 1 and Mn 2 modules. The MAP6(90-221+ 492-614) construct encompass the 3 of microtubules binding modules Mn1, Mn2 and Mn3. The MAP6(615-952) fragment corresponds to map6 4th exon which encodes the MAP6 C-terminal repeats (28 repetitions of 11 aa).

As compared to control, MAP6(90-177) fragment increased the microtubule growth rate (Figure 4A) similarly to MAP6-N (Figure 3C). Mn1 and Mn2 domains were thus responsible of the increase of microtubule growth rate. Interestingly the MAP6(90-221+ 492-614) fragment, contrary to the MAP6(90-177) fragment decreased the microtubule growth rate indicating that the Mn3 domain behave differently from Mn1 and Mn2.

Concerning shrinkage/rescue frequencies, MAP6(90-177) and MAP6(90-221+492-614) fragments, as MAP6-N, induce a stabilization of microtubules with very little events of shrinkage and a total rescue of these shrinkage events. Moreover and interestingly we also found that MAP6 (90-221+492-614) fragment strongly reduced the shrinking speed (Figure 4B), as compared to control. These results indicate that the presence of Mn3 domain in MAP6 (90-221+492-614) fragment severely reduced the dynamicity of microtubule (+) ends. In the full-length context of MAP6-N, Mn3 activity seemed to be inhibited allowing Mn1 and Mn2 to increase the microtubule growth rate. The MAP6 (615-952) fragment did not affect any parameters or microtubule dynamics. Altogether our results strongly suggest that within MAP6-N domains, Mn1 and Mn2 modules exhibited a positive effect on microtubule dynamic by increasing the growth rate whereas the Mn3 module exhibited a reduction of microtubule (+) ends dynamics.

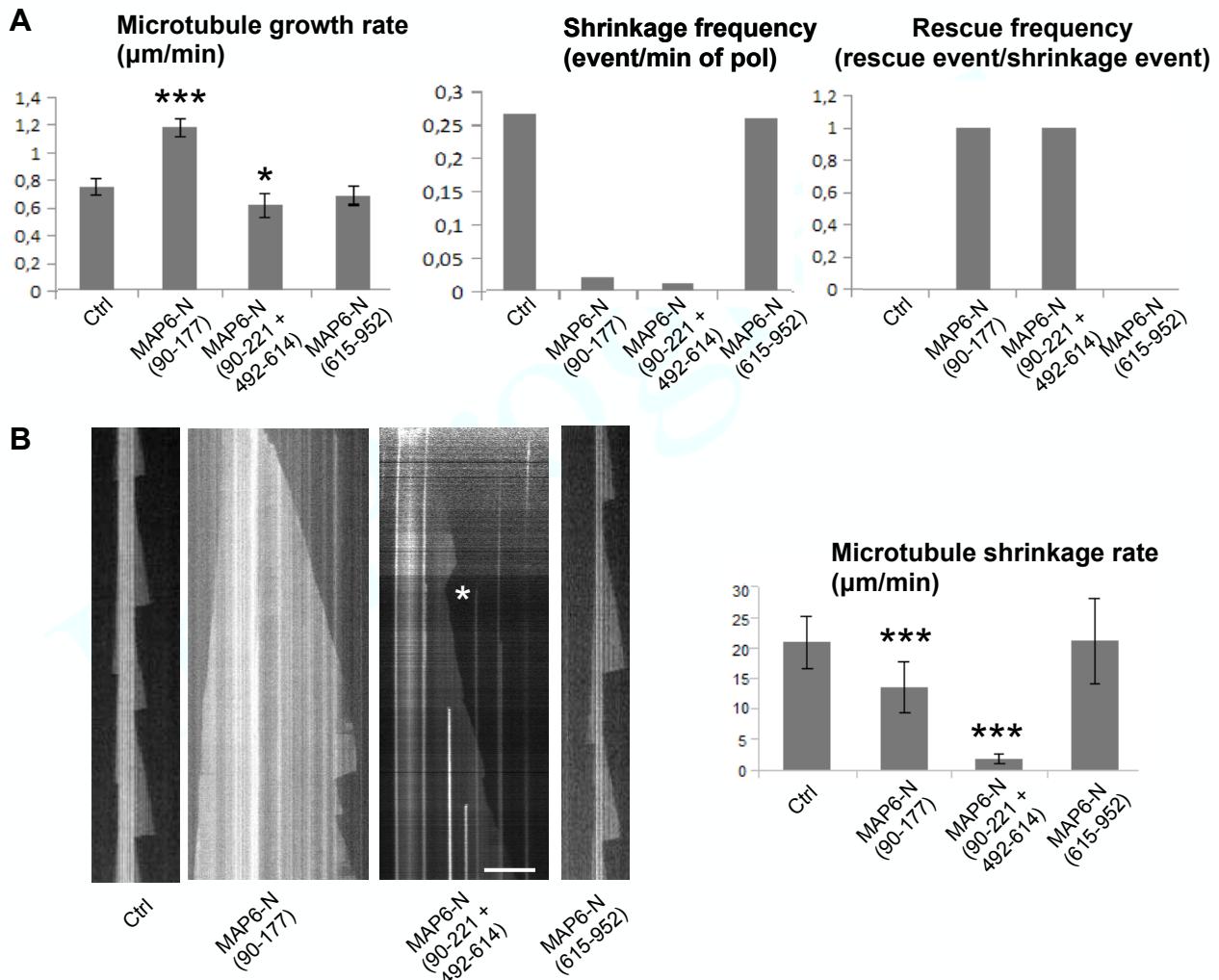


Figure 4 : Effect of MAP6 microtubules binding modules Mn on microtubule (+) ends dynamic

(A-B) Effect of MAP6 fragments on microtubule dynamics. (A) The effect of MAP6 (90-177), MAP6 (90-221+ 492-614) and MAP6 (615-952) fragments at 150 nM, on microtubule growth rate, shrinkage and rescue frequencies. (B) Kymograph representing the microtubule (+) end behavior in the presence of MAP6(90-177), MAP6(90-221+ 492-614) and MAP6(615-952) fragments. White star on kymograph indicates the reduction of the shrinkage speed. Scale bar 20 μm . Quantification of the shrinking rate were plotted for each fragment. Growth rates were $0.76 \pm 0.05 \mu\text{m}/\text{min}$ ($n=320$ min) for control conditions and $1.17 \pm 0.12 \mu\text{m}/\text{min}$ ($n=983$ min); $0.61 \pm 0.17 \mu\text{m}/\text{min}$ ($n=913$ min); $0.68 \pm 0.13 \mu\text{m}/\text{min}$ ($n=613$ min) for MAP6(90-177), MAP6(90-221+ 492-614) and MAP6(615-952) fragments, respectively. Shrinkage rate rates were $20.1 \pm 4.97 \mu\text{m}/\text{min}$ ($n=21$ min) for control conditions and $13.57 \pm 4.12 \mu\text{m}/\text{min}$ ($n=21$ min); $1.82 \pm 0.8 \mu\text{m}/\text{min}$ ($n=60$ min); $21.1 \pm 7.04 \mu\text{m}/\text{min}$ ($n=13$ min) for MAP6(90-177), MAP6(90-221+ 492-614) and MAP6(615-952) fragments, respectively. Catastrophe frequencies were 0.22 event/min of polymerization for control conditions and 0.017 event/min of polymerization; 0.089 event/min of polymerization and 0.25 event/min of polymerization for MAP6(90-177), MAP6(90-221+ 492-614) and MAP6(615-952) fragments, respectively. Rescue frequencies were 0.73% for control conditions; 100%, 100% and 0.10% (event/shrinkage event) for MAP6(90-177), MAP6(90-221+ 492-614) and MAP6(615-952) fragments, respectively. Statistical significance was obtained using t test, * $p < 5\%$, *** $p < 0.1\%$.

Effect of MAP6 protein on microtubule (-) ends dynamics

Although less dynamic than the microtubule (+) ends, the microtubule (-) ends also undergo some length variations *in vitro*. Recently, proteins of the CAMSAP/Patronin/Nezha family were shown to specifically target microtubule (-) ends and modulate their dynamics (Hendershott and Vale, 2014; Jiang et al., 2014; Tanaka et al., 2012; Yau et al., 2014). Here, we monitored as for the microtubule (+) ends, the possible role of MAP6-N in the control of microtubule (-) ends dynamics using TIRF imaging (Figure 5). As expected, in control conditions, microtubule (-) ends in the presence of 10 μM of tubulin were extremely dynamic (Figure 5A, top kymographs red arrow) with a polymerization speed of approximately $0.22 \pm 0.11 \text{ } \mu\text{m/min}$ ($n=119 \text{ min}$) and a catastrophe frequency of 17 % (event/min of polymerization). Strikingly in presence of 150 nM of MAP6-N, the (-) ends dynamicity was mostly abolished (Figure 5 A bottom kymograph). On some extremities, very short periods of polymerization were observed followed by a rapid freezing, with no more polymerization nor depolymerization. We then tested, the propensity of MAP6 fragments bearing the MAP6 microtubule binding domains, to carry MAP6 effects on microtubule (-) ends stabilization. Surprisingly, we found that MAP6(90-177) fragment, which contain Mn1 and Mn2 modules, inhibited microtubule (-) ends catastrophes (0% as compared to 17%) allowing a continuous growth of microtubule minus (-) ends (growth rate of $0.24 \pm 0.06 \text{ } \mu\text{m/min}$; $n=1007 \text{ min}$). In contrast, MAP6 (90-221+492-614) fragment which contains Mn1, Mn2 and Mn3 modules induce a complete inhibition of microtubule (-) ends growth, as found for MAP6-N (Figure 5B, kymographs). Altogether these results indicate a role of Mn3 in the blockade of microtubule (-) ends dynamics.

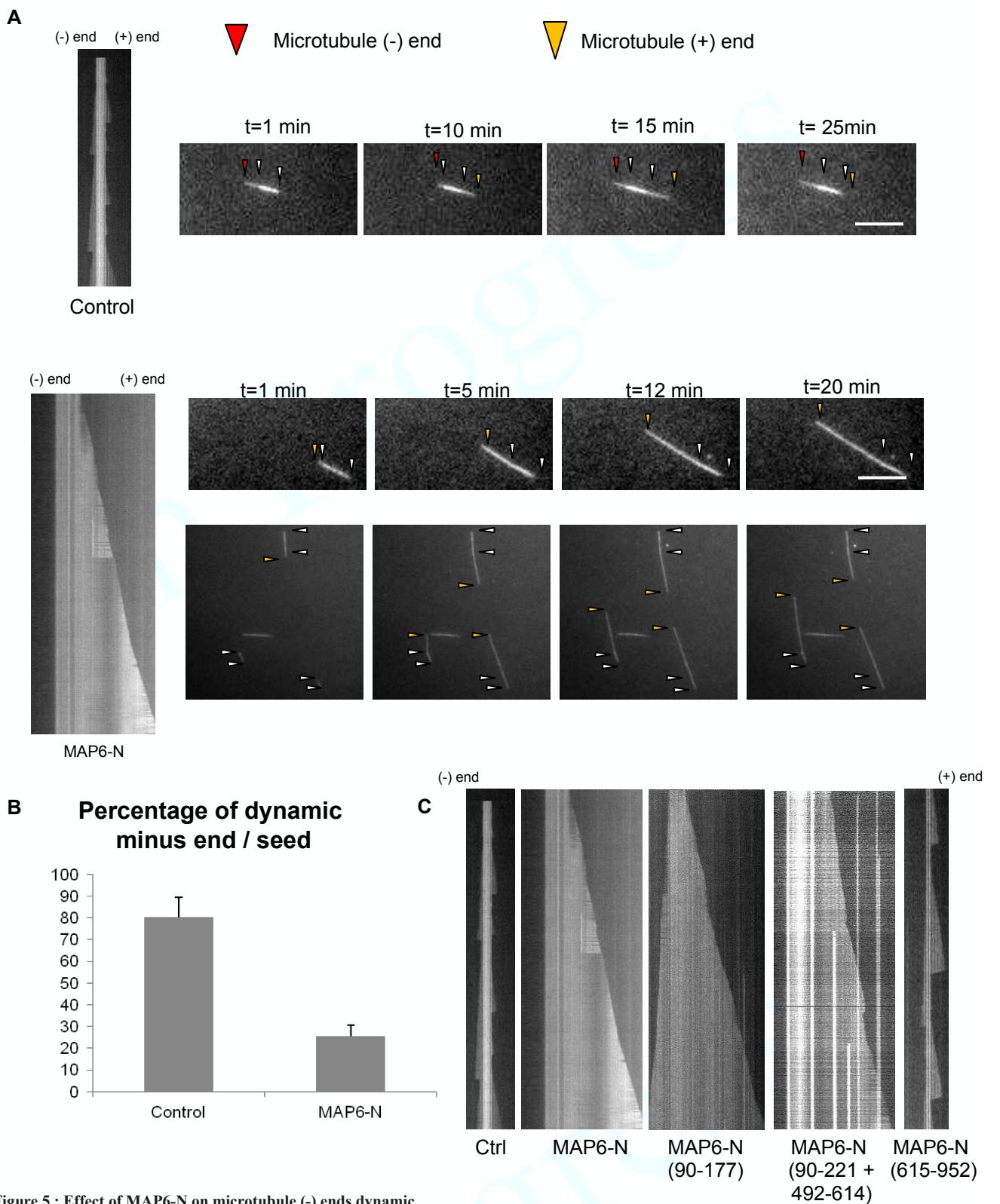


Figure 5 : Effect of MAP6-N on microtubule (-) ends dynamic

(A) Kymograph and pictures taken at different indicated time of microtubules grown from GMPCPP-stabilized microtubule seed (white arrows) with 10 μ M of tubulin in the absence (top lines) or in the presence (bottom lines) of MAP6-N (100nM). Red and yellow arrows indicate the dynamic microtubule (-) and (+) ends extremities respectively. Scale bar = 20 μ m. (B) Percentages of microtubules from (A) which displayed a dynamic minus (-) ends are plotted. (C) Kymographs showing the dynamics of microtubule (-) ends in the presence of 100nM of MAP6 fragments and obtained as in (A) are compared to the control and MAP6-N conditions.

Discussion

MAP6 proteins have been shown to be essential for the stabilization of microtubules in cells at 4 °C as well as to protect cellular microtubules from nocodazole exposure at 37°C . Such abilities rely on two types of microtubule binding domains; the Mc and the Mn modules. The Mc modules bind exclusively to the microtubules at 4°C whereas the interaction of the Mn modules with microtubules is temperature independent (Bosc et al., 2001; Delphin et al., 2012).

In this study, using purified recombinant MAP6 protein and MAP6 fragments we investigated, *in vitro*, the direct interaction between MAP6 and microtubules.

We demonstrated that MAP6 display a high apparent affinity (K_{dapp}) for microtubules, at physiological temperature, of 57 nM. This K_{dapp} value is very similar of the ones exhibited by the other classical structural MAPs like Tau or MAP2 (Duan and Goodson, 2012; Fauquant et al., 2011; Goode and Feinstein, 1994). Overall, MAP6 exert a stabilising effect on microtubules preventing their depolymerisation when the free tubulin is removed, stabilising effect similar to those reported for Tau and MAP2. Moreover, as reported for Tau (Weingarten et al., 1975), MAP6 allows microtubule spontaneous nucleation.

Concerning microtubule dynamics; as reported for MAP2 and Tau, MAP6 increases the microtubule (+) end growth rate and stabilizes these ends by strongly reducing the shrinkage frequency and allowing rescue events (Drechsel et al., 1992; Gamblin et al., 1996; Kowalski and Williams, 1993; Trinczek et al., 1995). Altogether, regarding the regulation of microtubule dynamics at the (+) ends, MAP6 behaves like the other classical stabilizing structural MAPs. In accordance with the results obtained in cells after transfection with MAP6 cDNAs (Bosc et al., 2001) we found that MAP6 binding on microtubules at 37°C depends on the Mn modules. More precisely, thanks to several constructs, we demonstrated that the Mn1 and Mn2 modules were mainly responsible of the stabilization effect observed at microtubule (+) ends; acting positively on microtubule growth rate, shrinkage rate and shrinkage/rescue frequency. Surprisingly, the Mn3 domain displayed an opposite effect on the microtubule (+) ends, by strongly reducing the microtubule growth and shrinkage rates. In the context of the full length protein the effect of the Mn3 domain seemed to be silenced possibly by another part of the protein, suggesting conformational regulations.

The *in vivo* regulation of microtubule dynamics by structural MAPs including MAP6 was not reported to be vital as the deletion of each MAP or even of two of them did not resulted in a massive microtubule depolymerisation or microtubule instability (Andrieux et al., 2002; Harada et al., 1994; Ke et al., 2012; Takei et al., 1997). However, the regulation of microtubule dynamics by structural MAPs might rather very be of importance during neuronal plasticity events when dynamic microtubules are playing roles when entering the dendritic spines for example (Jaworski et

al., 2009). In accordance with this possible role in synaptic plasticity during cognitive events, the deletion, in mice, of either Tau, MAP1 or MAP6 induced plasticity defects (Ahmed et al., 2014; Andrieux et al., 2002; Takei et al., 2015).

In this study, we also discovered that MAP6 protein has a strong effect on the microtubule (-) ends. A very large number of studies have reported the roles of microtubule plus-ends dynamics as well as of their regulation by the +TIPs or by the structural MAPs. On the contrary, microtubule (-) ends dynamic is one of the least well-understood aspect of microtubules, in respect of their behaviour and organization. Similar lack of data also apply for the cellular regulation of the (-) ends dynamics. Very recently, some studies have characterized a family of proteins targeting specifically the microtubule (-) ends, the -TIPs, the CAMSAP/Patronin/Nezha family (Hendershott and Vale, 2014; Jiang et al., 2014; Tanaka et al., 2012; Yau et al., 2014). MAP6, as CAMSAP proteins act on the minus-ends by strongly reducing their dynamicity and by rapidly freezing this extremity. Using MAP6 fragments, we determined that the MAP6 effects on the minus-ends contrary to the ones on the plus-ends were not driven by the Mn1 and Mn2 modules but rather carried by the Mn3 module which seemed to be responsible for the stabilisation of the minus-end mimicking the CAMSAP effects (Hendershott and Vale, 2014; Jiang et al., 2014; Tanaka et al., 2012; Yau et al., 2014). CAMSAP proteins stabilize the microtubule (-) ends and form seeds able to undergo polymerizing and depolymerising events (Yau et al., 2014), it is tempting to propose that the stabilisation of microtubule (-) ends by the Mn3 domain of MAP6 might contribute to the ability of MAP6 to nucleate microtubules.

Overall this study demonstrate that even if MAP6 exert similar roles as the structural MAPs tau and MAP2 on the dynamic of the microtubule (+) ends, MAP6 effects on the microtubule (-) ends is unique among the MAPs. Moreover, MAP6 exhibit the particularity to have a dual-effect on both microtubule (+) ends like a structural MAP and (-) ends like a minus-TIP. Further studies will determine the physiological roles of such dual ability toward the two microtubules ends.

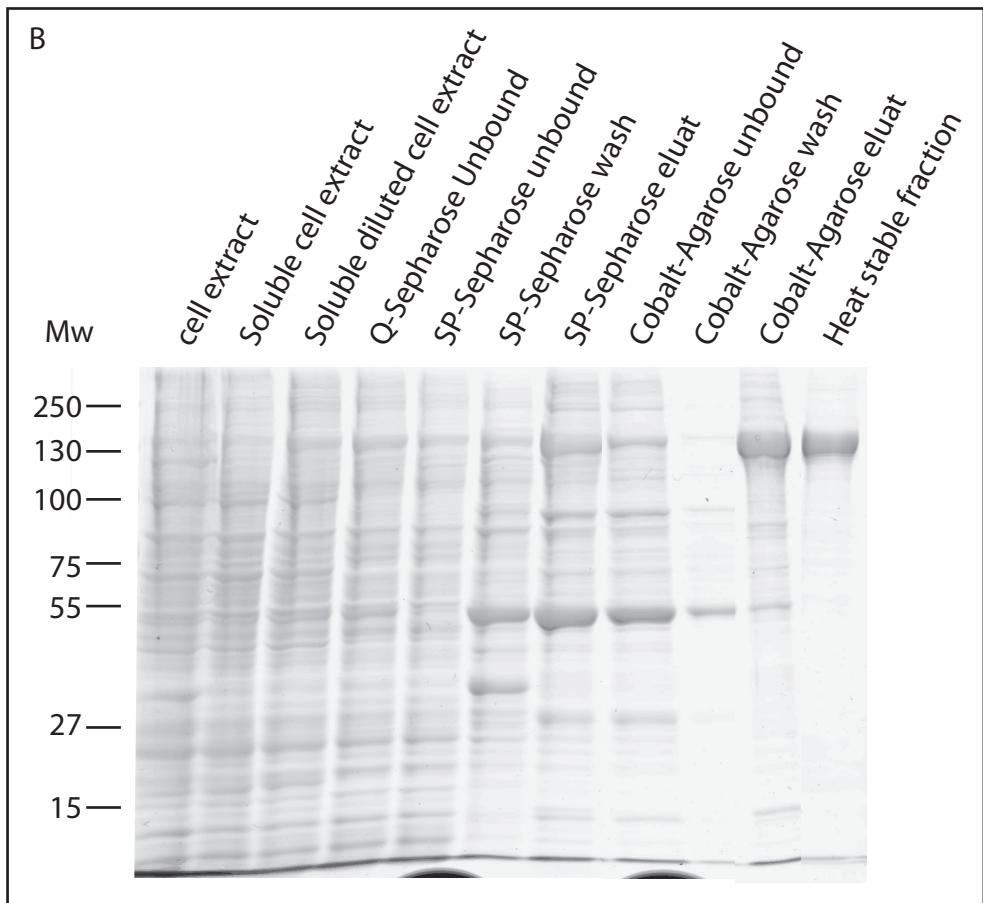
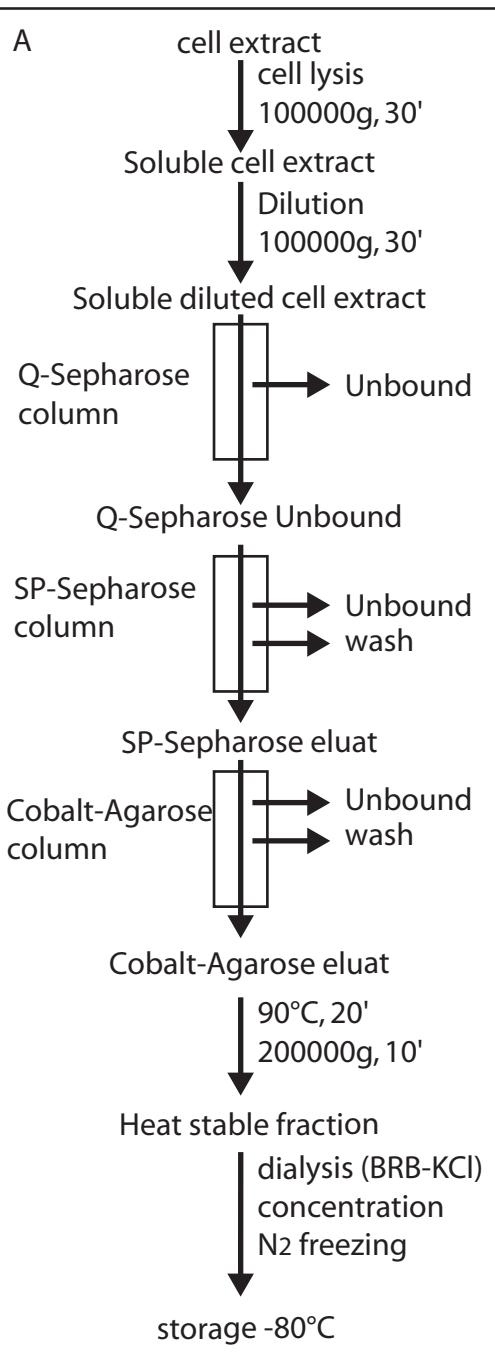
References

- Aguezzoul, M., A. Andrieux, and E. Denarier. 2003. Overlap of promoter and coding sequences in the mouse STOP gene (Mtap6). *Genomics*. 81:623-627.
- Ahmed, T., A. Van der Jeugd, D. Blum, M.C. Galas, R. D'Hooge, L. Buee, and D. Balschun. 2014. Cognition and hippocampal synaptic plasticity in mice with a homozygous tau deletion. *Neurobiol Aging*.
- Andrieux, A., P. Salin, A. Schweitzer, M. Begou, B. Pachoud, P. Brun, S. Gory-Faure, P. Kujala, M.F. Suaud-Chagny, G. Hofle, and D. Job. 2006. Microtubule stabilizer ameliorates synaptic function and behavior in a mouse model for schizophrenia. *Biological psychiatry*. 60:1224-1230.
- Andrieux, A., P.A. Salin, M. Vernet, P. Kujala, J. Baratier, S. Gory-Faure, C. Bosc, H. Pointu, D. Proietto, A. Schweitzer, E. Denarier, J. Klumperman, and D. Job. 2002. The suppression of brain cold-stable microtubules in mice induces synaptic defects associated with neuroleptic-sensitive behavioral disorders. *Genes Dev*. 16:2350-2364.
- Baratier, J., L. Peris, J. Brocard, S. Gory-Faure, F. Dufour, C. Bosc, A. Fourest-Lievin, L. Blanchoin, P. Salin, D. Job, and A. Andrieux. 2006. Phosphorylation of microtubule-associated protein STOP by calmodulin kinase II. *J Biol Chem*. 281:19561-19569.
- Begou, M., J. Volle, J.B. Bertrand, P. Brun, D. Job, A. Schweitzer, M. Saoud, T. D'Amato, A. Andrieux, and M.F. Suaud-Chagny. 2008. The stop null mice model for schizophrenia displays cognitive and social deficits partly alleviated by neuroleptics. *Neuroscience*. 157:29-39.
- Bosc, C., J.D. Cronk, F. Pirollet, D.M. Watterson, J. Haiech, D. Job, and R.L. Margolis. 1996. Cloning, expression, and properties of the microtubule-stabilizing protein STOP. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 93:2125-2130.
- Bosc, C., R. Frank, E. Denarier, M. Ronjat, A. Schweitzer, J. Wehland, and D. Job. 2001. Identification of novel bifunctional calmodulin-binding and microtubule-stabilizing motifs in STOP proteins. *J Biol Chem*. 276:30904-30913.
- Bouvrais-Veret, C., S. Weiss, A. Andrieux, A. Schweitzer, J.M. McIntosh, D. Job, B. Giros, and M.P. Martres. 2007. Sustained increase of alpha7 nicotinic receptors and choline-induced improvement of learning deficit in STOP knock-out mice. *Neuropharmacology*. 52:1691-1700.
- Bouvrais-Veret, C., S. Weiss, N. Hanoun, A. Andrieux, A. Schweitzer, D. Job, M. Hamon, B. Giros, and M.P. Martres. 2008. Microtubule-associated STOP protein deletion triggers restricted changes in dopaminergic neurotransmission. *J Neurochem*. 104:745-756.
- Brenner, E., U. Sonnewald, A. Schweitzer, A. Andrieux, and A. Nehlig. 2007. Hypoglutamatergic activity in the STOP knockout mouse: a potential model for chronic untreated schizophrenia. *J Neurosci Res*. 85:3487-3493.
- Brun, P., M. Begou, A. Andrieux, L. Mouly-Badina, M. Clerget, A. Schweitzer, H. Scarna, B. Renaud, D. Job, and M.F. Suaud-Chagny. 2005. Dopaminergic transmission in STOP null mice. *J Neurochem*. 94:63-73.
- Choi, K.H., M.E. Zepp, B.W. Higgs, C.S. Weickert, and M.J. Webster. 2009. Expression profiles of schizophrenia susceptibility genes during human prefrontal cortical development. *Journal of psychiatry & neuroscience : JPN*. 34:450-458.
- Daoust, A., S. Bohic, Y. Saoudi, C. Debacker, S. Gory-Faure, A. Andrieux, E.L. Barbier, and J.C. Deloulme. 2014. Neuronal transport defects of the MAP6 KO mouse - a model of schizophrenia - and alleviation by Epothilone D treatment, as observed using MEMRI. *NeuroImage*. 96:133-142.

- Delotterie, D., G. Ruiz, J. Brocard, A. Schweitzer, C. Roucard, Y. Roche, M.F. Suaud-Chagny, K. Bressand, and A. Andrieux. 2010. Chronic administration of atypical antipsychotics improves behavioral and synaptic defects of STOP null mice. *Psychopharmacology (Berl)*. 208:131-141.
- Deloulme, J.C., S. Gory-Faure, F. Mauconduit, S. Chauvet, J. Jonckheere, B. Boulan, E. Mire, J. Xue, M. Jany, C. Maucler, A.A. Deparis, O. Montigon, A. Daoust, E.L. Barbier, C. Bosc, N. Deglon, J. Brocard, E. Denarier, I. Le Brun, K. Pernet-Gallay, I. Vilgrain, P.J. Robinson, H. Lahrech, F. Mann, and A. Andrieux. 2015. Microtubule-associated protein 6 mediates neuronal connectivity through Semaphorin 3E-dependent signalling for axonal growth. *Nature communications*. 6:7246.
- Delphin, C., D. Bouvier, M. Seggio, E. Couriol, Y. Saoudi, E. Denarier, C. Bosc, O. Valiron, M. Bisbal, I. Arnal, and A. Andrieux. 2012. MAP6-F is a temperature sensor that directly binds to and protects microtubules from cold-induced depolymerization. *J Biol Chem*. 287:35127-35138.
- Denarier, E., M. Aguezzoul, C. Jolly, C. Vourc'h, A. Roure, A. Andrieux, C. Bosc, and D. Job. 1998a. Genomic structure and chromosomal mapping of the mouse STOP gene (Mtap6). *Biochem Biophys Res Commun*. 243:791-796.
- Denarier, E., A. Fourest-Lievin, C. Bosc, F. Pirollet, A. Chapel, R.L. Margolis, and D. Job. 1998b. Nonneuronal isoforms of STOP protein are responsible for microtubule cold stability in mammalian fibroblasts. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 95:6055-6060.
- Drechsel, D.N., A.A. Hyman, M.H. Cobb, and M.W. Kirschner. 1992. Modulation of the dynamic instability of tubulin assembly by the microtubule-associated protein tau. *Mol Biol Cell*. 3:1141-1154.
- Duan, A.R., and H.V. Goodson. 2012. Taxol-stabilized microtubules promote the formation of filaments from unmodified full-length Tau in vitro. *Mol Biol Cell*. 23:4796-4806.
- Fauquant, C., V. Redeker, I. Landrieu, J.M. Wieruszseski, D. Verdegem, O. Laprevote, G. Lippens, B. Gigant, and M. Knossow. 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*.
- Fournet, V., G. de Lavilleon, A. Schweitzer, B. Giros, A. Andrieux, and M.P. Martres. 2012a. Both chronic treatments by epothilone D and fluoxetine increase the short-term memory and differentially alter the mood status of STOP/MAP6 KO mice. *J Neurochem*. 123:982-996.
- Fournet, V., A. Schweitzer, C. Chevarin, J.C. Deloulme, M. Hamon, B. Giros, A. Andrieux, and M.P. Martres. 2012b. The deletion of STOP/MAP6 protein in mice triggers highly altered mood and impaired cognitive performances. *J Neurochem*. 121:99-114.
- Gamblin, T.C., K. Nachmanoff, S. Halpain, and R.C. Williams, Jr. 1996. Recombinant microtubule-associated protein 2c reduces the dynamic instability of individual microtubules. *Biochemistry*. 35:12576-12586.
- Goedert, M., R.A. Crowther, and C.C. Garner. 1991. Molecular characterization of microtubule-associated proteins tau and MAP2. *Trends Neurosci*. 14:193-199.
- Goode, B.L., and S.C. Feinstein. 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.
- Gory-Faure, S., V. Windscheid, C. Bosc, L. Peris, D. Proietto, R. Franck, E. Denarier, D. Job, and A. Andrieux. 2006. STOP-like protein 21 is a novel member of the STOP family, revealing a Golgi localization of STOP proteins. *J Biol Chem*. 281:28387-28396.

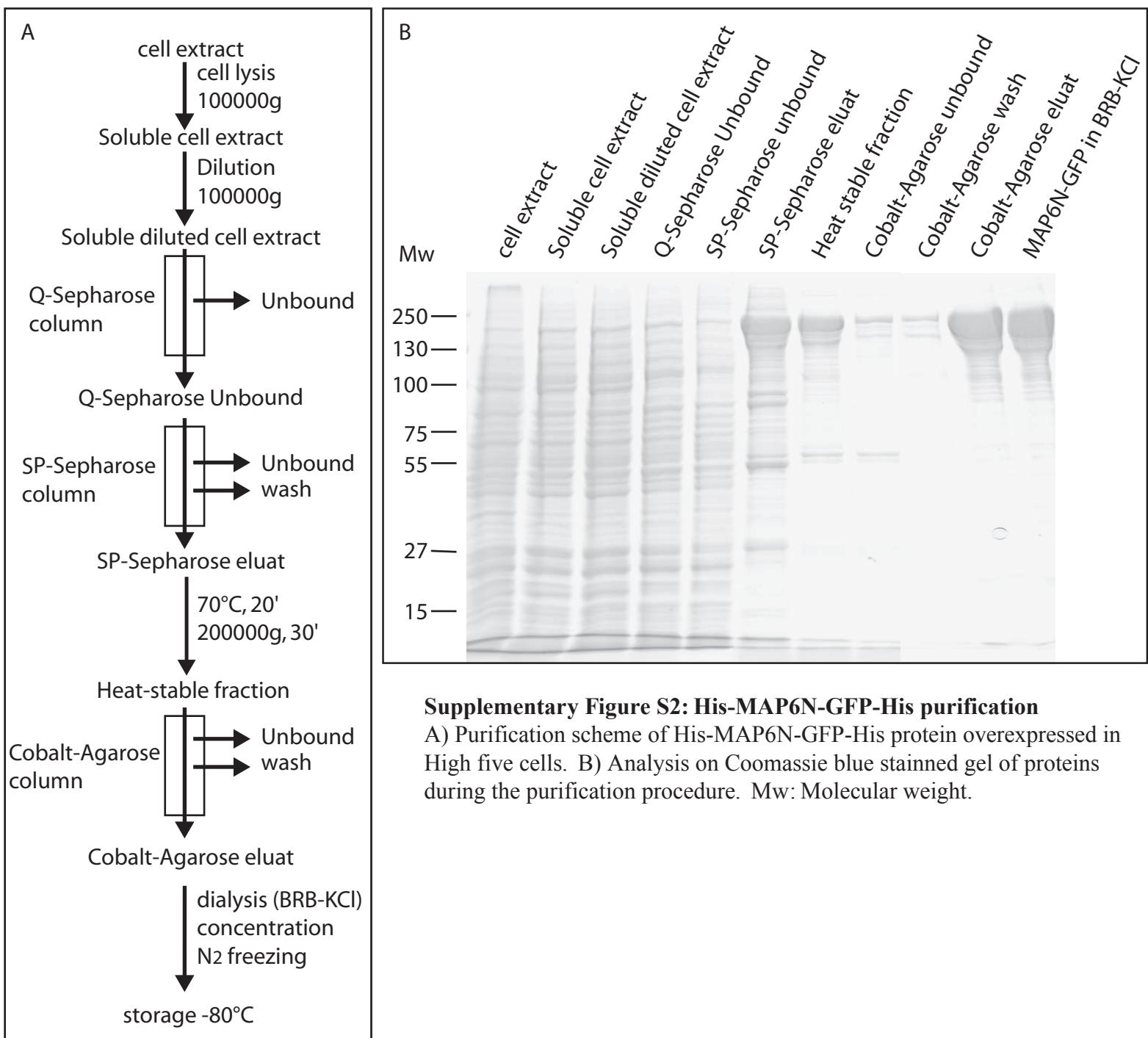
- Gory-Faure, S., V. Windscheid, J. Brocard, S. Montessuit, R. Tsutsumi, E. Denarier, Y. Fukata, C. Bosc, J. Delaroche, N. Collomb, M. Fukata, J.C. Martinou, K. Pernet-Gallay, and A. Andrieux. 2014. Non-Microtubular Localizations of Microtubule-Associated Protein 6 (MAP6). *PLoS one*. 9:e114905.
- Guillaud, L., C. Bosc, A. Fourest-Lievin, E. Denarier, F. Pirollet, L. Lafanechere, and D. Job. 1998. STOP proteins are responsible for the high degree of microtubule stabilization observed in neuronal cells. *J Cell Biol*. 142:167-179.
- Harada, A., K. Oguchi, S. Okabe, J. Kuno, S. Terada, T. Ohshima, R. Sato-Yoshitake, Y. Takei, T. Noda, and N. Hirokawa. 1994. Altered microtubule organization in small-calibre axons of mice lacking tau protein. *Nature*. 369:488-491.
- Hendershott, M.C., and R.D. Vale. 2014. Regulation of microtubule minus-end dynamics by CAMSAPs and Patronin. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 111:5860-5865.
- 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.
- Jaworski, J., L.C. Kapitein, S.M. Gouveia, B.R. Dortland, P.S. Wulf, I. Grigoriev, P. Camera, S.A. Spangler, P. Di Stefano, J. Demmers, H. Krugers, P. Defilippi, A. Akhmanova, and C.C. Hoogenraad. 2009. Dynamic microtubules regulate dendritic spine morphology and synaptic plasticity. *Neuron*. 61:85-100.
- Jiang, K., S. Hua, R. Mohan, I. Grigoriev, K.W. Yau, Q. Liu, E.A. Katrukha, A.F. Altelaar, A.J. Heck, C.C. Hoogenraad, and A. Akhmanova. 2014. Microtubule minus-end stabilization by polymerization-driven CAMSAP deposition. *Dev Cell*. 28:295-309.
- Job, D., C.T. Rauch, and R.L. Margolis. 1987. High concentrations of STOP protein induce a microtubule super-stable state. *Biochem Biophys Res Commun*. 148:429-434.
- Ke, Y.D., A.K. Suchowerska, J. van der Hoven, D.M. De Silva, C.W. Wu, J. van Eersel, A. Ittner, and L.M. Ittner. 2012. Lessons from tau-deficient mice. *International journal of Alzheimer's disease*. 2012:873270.
- Kowalski, R.J., and R.C. Williams, Jr. 1993. Microtubule-associated protein 2 alters the dynamic properties of microtubule assembly and disassembly. *J Biol Chem*. 268:9847-9855.
- Margolis, R.L., C.T. Rauch, and D. Job. 1986a. Purification and assay of a 145-kDa protein (STOP145) with microtubule-stabilizing and motility behavior. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 83:639-643.
- Margolis, R.L., C.T. Rauch, and D. Job. 1986b. Purification and assay of cold-stable microtubules and STOP protein. *Methods Enzymol*. 134:160-170.
- Margolis, R.L., C.T. Rauch, F. Pirollet, and D. Job. 1990. Specific association of STOP protein with microtubules in vitro and with stable microtubules in mitotic spindles of cultured cells. *Embo J*. 9:4095-4502.
- Martins-de-Souza, D., W.F. Gattaz, A. Schmitt, C. Rewerts, G. Maccarrone, E. Dias-Neto, and C.W. Turck. 2009. Prefrontal cortex shotgun proteome analysis reveals altered calcium homeostasis and immune system imbalance in schizophrenia. *Eur Arch Psychiatry Clin Neurosci*. 259:151-163.
- Merenlender-Wagner, A., R. Pikman, E. Giladi, A. Andrieux, and I. Gozes. 2010. NAP (davunetide) enhances cognitive behavior in the STOP heterozygous mouse--a microtubule-deficient model of schizophrenia. *Peptides*. 31:1368-1373.
- Mitchison, T., and M. Kirschner. 1984. Dynamic instability of microtubule growth. *Nature*. 312:237-242.

- Powell, K.J., S.E. Hori, R. Leslie, A. Andrieux, H. Schellinck, M. Thorne, and G.S. Robertson. 2007. Cognitive impairments in the STOP null mouse model of schizophrenia. *Behav Neurosci.* 121:826-835.
- Shimizu, H., Y. Iwayama, K. Yamada, T. Toyota, Y. Minabe, K. Nakamura, M. Nakajima, E. Hattori, N. Mori, N. Osumi, and T. Yoshikawa. 2006. Genetic and expression analyses of the STOP (MAP6) gene in schizophrenia. *Schizophrenia research.* 84:244-252.
- Takei, Y., Y.S. Kikkawa, N. Atapour, T.K. Hensch, and N. Hirokawa. 2015. Defects in Synaptic Plasticity, Reduced NMDA-Receptor Transport, and Instability of Postsynaptic Density Proteins in Mice Lacking Microtubule-Associated Protein 1A. *The Journal of neuroscience : the official journal of the Society for Neuroscience.* 35:15539-15554.
- Takei, Y., S. Kondo, A. Harada, S. Inomata, T. Noda, and N. Hirokawa. 1997. Delayed development of nervous system in mice homozygous for disrupted microtubule-associated protein 1B (MAP1B) gene. *J Cell Biol.* 137:1615-1626.
- Takemura, R., S. Okabe, T. Umeyama, Y. Kanai, N.J. Cowan, and N. Hirokawa. 1992. Increased microtubule stability and alpha tubulin acetylation in cells transfected with microtubule-associated proteins MAP1B, MAP2 or tau. *J Cell Sci.* 103 (Pt 4):953-964.
- Tanaka, N., W. Meng, S. Nagae, and M. Takeichi. 2012. Nezha/CAMSAP3 and CAMSAP2 cooperate in epithelial-specific organization of noncentrosomal microtubules. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 109:20029-20034.
- Trinczek, B., J. Biernat, K. Baumann, E.M. Mandelkow, and E. Mandelkow. 1995. Domains of tau protein, differential phosphorylation, and dynamic instability of microtubules. *Mol Biol Cell.* 6:1887-1902.
- Wei, H., Y. Ma, J. Liu, C. Ding, F. Hu, and L. Yu. 2016. Proteomic analysis of cortical brain tissue from the BTBR mouse model of autism: Evidence for changes in STOP and myelin-related proteins. *Neuroscience.* 312:26-34.
- Weingarten, M.D., A.H. Lockwood, S.Y. Hwo, and M.W. Kirschner. 1975. A protein factor essential for microtubule assembly. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 72:1858-1862.
- Yau, K.W., S.F. van Beuningen, I. Cunha-Ferreira, B.M. Cloin, E.Y. van Battum, L. Will, P. Schatzle, R.P. Tas, J. van Krugten, E.A. Katrukha, K. Jiang, P.S. Wulf, M. Mikhaylova, M. Harterink, R.J. Pasterkamp, A. Akhmanova, L.C. Kapitein, and C.C. Hoogenraad. 2014. Microtubule Minus-End Binding Protein CAMSAP2 Controls Axon Specification and Dendrite Development. *Neuron.* 82:1058-1073.



Supplementary Figure S1: His-MAP6N purification.

A) Purification scheme of His-MAP6N protein overexpressed in High five cells. B) Analysis on Coomassie blue stained gel of proteins during the purification procedure. Mw: Molecula weight.



Supplementary Figure S2: His-MAP6N-GFP-His purification

A) Purification scheme of His-MAP6N-GFP-His protein overexpressed in High five cells. B) Analysis on Coomassie blue stained gel of proteins during the purification procedure. Mw: Molecular weight.

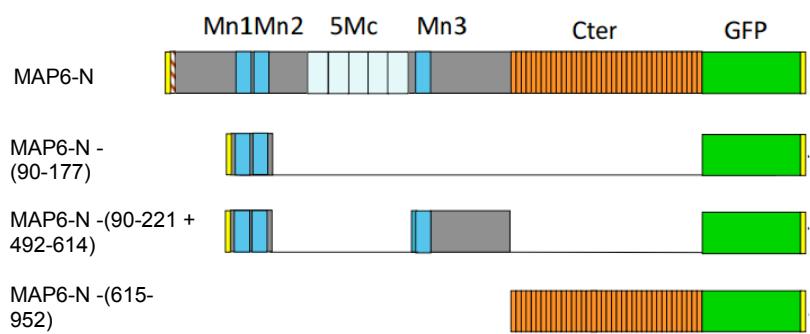


Figure S3 : Schematic representation of the different recombinant MAP6 fragments

Article 3

Résumé de l'article "**Microtubules adopt an helical shape in presence of MAP6**" by Seggio et al.

Les microtubules sont des éléments structuraux importants dans les cellules et vont jouer un rôle dans la morphologie et le maintien de la forme de la cellule mais aussi dans la motilité cellulaire et le transport. Du fait de leur rôle et de leur composition, les microtubules adoptent naturellement une forme droite et sont l'élément le plus rigide du cytosquelette. Cependant certaines protéines peuvent influer sur la flexibilité des microtubules de façon à ce que ceux-ci puissent se courber et assurer d'autres fonctions au sein de la cellule.

Dans cette étude, à l'aide d'un système reconstitué *in vitro* à partir de protéines purifiées en vidéomicroscopie, nous avons essayé de déterminer si la protéine MAP6 pouvait avoir un effet sur la structure des microtubules.

Ainsi de façon surprenante, nous nous sommes rapidement aperçus en DIC microscopie qu'en présence de la protéine MAP6, les microtubules perdaient leur forme droite caractéristique pour en adopter une nouvelle en forme de vague sinusoïdale. L'étude en vidéomicroscopie TIRF nous a par la suite révélée que les microtubules n'adoptaient pas une forme sinusoïdale mais adoptaient une forme d'hélice qui n'avait jamais été observée auparavant, caractérisée en TIRF par des microtubules apparaissant en pointillés. Des expériences de perfusion ont également permis de déterminer que l'adoption de cette conformation ne se produit que lors de la polymérisation du microtubule en présence de MAP6, celle-ci ne peut modifier la structure de microtubules déjà polymérisés.

L'étude en microscopie TRIF a permis de déterminer certains paramètres de l'hélice microtubulaire. Ainsi du fait de la technologie et du principe du TIRF, nous avons pu déterminer que l'hélice microtubulaire polymérisait en sens antihoraire. Le pas de l'hélice est d'environ 4,5 µm et est indépendant de la concentration de tubuline libre. De façon intéressante, l'effet observé se produit dans une certaine gamme de concentration de la protéine MAP6. Ainsi en dessous de 100 µM de MAP6, les microtubules restent en conformation droite, alors qu'entre 100 et 200 µM, les microtubules polymérisent en hélice. Au-delà de 200 µM, les microtubules nucléent spontanément, rendant les observations difficiles. Cependant, dans le cas de la nucléation, les microtubules semblent au début être en hélice puis redevenir rapidement droit, ce qui pourrait s'expliquer par une rapide déplétion de la concentration en MAP6.

Enfin l'étude des différentes isoformes révèle que la région N-terminale, en particulier les premiers acides aminés sont nécessaires à l'effet observé. Il semble donc que l'effet ne soit pas restreint aux domaines de liaisons aux microtubules. De plus, l'utilisation de GMPcpp et de GTPγS nous ont également appris que l'hydrolyse du GTP est nécessaire pour modifier la conformation des microtubules. Enfin, l'utilisation de la protéine de bout (+) EB1, capable de reconnaître la structure

en feuillet des microtubules en croissance, montre un marquage normal de l'extrémité du microtubule suggérant que la structure du feuillet ne semble pas modifiée par rapport à des conditions normales. La détermination du processus responsable de cette torsion reste à faire.

Microtubules adopt an helical shape in presence of MAP6

Maxime Seggio^{1,2,3}, Christophe Bosc^{1,2}, Yasmina Saoudi^{1,2}, Annie Andrieux^{1,2,3} and Christian Delphin^{1,2}

¹INSERM, U1216, F-38000 Grenoble, France

²Univ. Grenoble Alpes, Grenoble Institute Neurosciences, F-38000 Grenoble, France

³CEA, BIG, F-38000 Grenoble, France

Correspondence: Annie.Andrieux@univ-grenoble-alpes.fr or Christian.Delphin@univ-grenoble-alpes.fr

Abstract

Microtubules are major components of the eukaryotic cells cytoskeleton. They are formed by $\alpha\beta$ tubulin dimers which assemble to form protofilaments. These protofilaments then associate laterally into a sheet which close on himself to form a rigid and straight structure of 25 nm wide. Structural and mechanical properties of microtubules are matter of recent interest to determine how they exactly contribute to sculpt cell shape or to supply rigidity in cells. Also how exactly microtubule flexibility can participate to oriented cellular motility or to the exploration of specific sub-cellular areas are still open questions. Some microtubule-associated proteins (MAPs) were recently shown to modulate microtubules stiffness by either increasing or decreasing microtubule flexibility. Here we reported a novel microtubule shape induced by MAP6-N protein. Using several microscopy techniques, we indeed demonstrated that microtubules, in presence of MAP6, adopt a three dimensional helical shape. This structure depends on MAP6 concentration, is counterclockwise with a pitch of 4.5 μm and requires GTP hydrolysis. The helix thickness is around 1 μM , a value compatible with some metric of mature neurons such as the axon diameter.

Introduction

Microtubules are dynamic cytoskeletal elements involved in fundamental cellular processes. They participate to the regulation of the overall shape of cells contributing for example in the morphological features of the axons, the dendrites or the cilia. Microtubules are the most rigid intracellular cytoskeletal filaments due to their organization in a straight alpha-beta tubulin heterodimers hollow tube.

Generally, unless microtubules are exposed to exterior constraints like the viscosity of the medium or an interaction with the plasma membrane, they tend to remain straight polymers. However, microtubules have been reported to undergo some deformations such as bending in specific conditions. Microtubule associated proteins (MAPs) by modulating microtubule stiffness can influence microtubule bundling efficacy. Indeed Tau and MAP2 have been reported to increase microtubule stiffness whereas MAP65 reduces it (Dye et al., 1993 ; Mickey et Howard, 1995 ; Felgner et al., 1997 ; Portran et al., 2013). Another example of transient and local microtubule flexibility was reported in studies analyzing the joined behavior of microtubules and actin polymers in the presence of Tau protein (Elie 2015). In these conditions, when a straight microtubule encounters an actin filament and binds to its extremity, the microtubule deforms itself to adapt to the soft actin filament shape but rapidly readopts its initial straight shape and imposes this straight structure to the actin filament (Elie 2015). In physiological conditions microtubule flexibility might be of importance, as for example in neurons, during the transient entrance of microtubules in the dendritic spines, a process where microtubules from the dendritic shaft have to operate a strong curvature to enter the spines (Jaworski et al., 2009).

MAP6 proteins belong to the structural MAPs family and was shown, when overexpressed in cells, to bind and stabilize microtubules against cold exposure or nocodazole treatment (Bosc et al., 1996; Bosc et al., 2001; Denarier et al., 1998; Guillaud et al., 1998). Recently, recombinant MAP6-N protein, the longest MAP6 isoform, was shown to regulate microtubule dynamics and microtubule nucleation (Seggio *et al.* in preparation). In this study, using *in vitro* assays coupled to microscopy techniques, we demonstrated that when microtubules were grown in the presence of MAP6-N, they lose their classical shape to adopt a counterclockwise helical conformation. Using the non hydrolysable analogues of GTP, GMPcpp and GTP γ s, we showed that this structural effect necessitated GTP hydrolysis. The ability of MAP6 proteins to promote microtubule helical conformation required almost the complete MAP6-N as MAP6 fragments were unable to promote the torsion of microtubules.

Materials and Methods

Preparation of Tubulin

Tubulin was purified from bovine brain and labeled with ATTO-565 (ATTO-TEC GmbH, Germany) (Hyman et al., 1991).

Recombinant proteins expression.

For His-MAP6-N expression, full length MAP6-N (amino acids 1 to 952) was cloned in pFastBac-Htb. For expression of His-MAP6-N-GFP-His the corresponding MAP6-N sequences were cloned into pFastBac-Htb in fusion with an additional GFP and histidine-Tag at the C-terminal. Recombinant bacmids were produced by transforming DH10BAC bacteria cells with the constructs and allowed to obtain baculovirus through transformation of SF9 insect cells using Fugen HD (ThermoFischer). For expression of recombinant proteins, High 5 cells in suspension at 2.10^6 cells/ml were infected with baculovirus, harvested after 48h of incubation at 27°C and stored at -80°C.

Purification of the His-MAP6-N

From 50mL of infected Hi5 insect cells culture, the pellet was resuspended in 5 mL of lysis Buffer containing 50 mM Hepes pH7,4; 400 mM NaCl; 1 mM EGTA/EDTA; 0,5% Triton; 1 protease inhibitor tablet mini (Roche). Cells were then centrifuged at 150 000 xg at 4°C for 30 min and the supernatant was diluted 10 times with the dilution buffer (50 mM Hepes pH7,4 ; 0,5% Triton ; 1 mM EGTA/EDTA) and centrifuged again at 150 00xg at 4°C for 30 min. The SN was then loaded on 4 mL Q sepharose column equilibrated with Q/SP column buffer (50mM Hepes pH7,4 ; 200mM NaCl ; 0,5% Triton). The flow trough added to 2 column volume washes (Q/SP column buffer) was saved and loaded on 5 mL SP sepharose column equilibrated in Q/SP column buffer. The column was washed with Q/SP column buffer and eluted with 5 column volumes of SP elution buffer (50 mM Hepes pH7,4 ; 400 mM NaCl ; 0,05% Triton). The SN was heated at 90°C for 25 minutes then centrifuged at 250 000 x g for 15 minutes at 4°C and the SN recovered. Imidazole (6 mM) was added to the eluate and next loaded on a cobalt column (2 mL) equilibrated with SP-imidazole 6mM buffer. The cobalt column was successively washed with SP-imidazole 6 mM buffer, SP-imidazole 20 mM buffer. Elution was performed with SP-imidazole 200 mM buffer. The eluate was next dialysed (Slide-A-Lyzer Dialysis Cassette ThermoScientific) in BRB80 buffer (80 mM Pipes ; 1 mM EGTA ; 1 mM MgCl₂ pH6,9) frozen in liquid nitrogen and stored at -80°C.

Purification of the His-MAP6-N-GFP-His protein

From 50mL of infected High5 insect cells culture, the pellet was resuspended in 5 mL of lysis Buffer containing 50 mM Hepes pH7,4 ; 0,5 M Arginine ; 1 mM EGTA/EDTA ; 1 protease inhibitor tablet mini (Roche). Cells were then centrifuged at 150 000 g at 4°C for 30 min

and the supernatant was diluted 10 times in the dilution buffer (50 mM Hepes pH7,4 ; 100 mM NaCl ; 0,1% Triton ; 1 mM EGTA/EDTA) and centrifuged again at 150 00 g at 4°C for 30 min. The SN was then loaded on 4mL Q sepharose column equilibrated with Q/SP column buffer (50mM Hepes pH7,4 ; 150mM NaCl ; 0,05% Triton). The flow added to 2 column volume washes (Q/SP column buffer) was loaded on 5mL SP sepharose column equilibrated in Q/SP column buffer. The column was washed with Q/SP column buffer and eluted with 5 column volume of SP elution buffer (50mM Hepes pH7,4 ; 400mM NaCl ; 0,05% Triton. Imidazole (6mM) was added to the eluate and next loaded on a cobalt column (2 mL) equilibrated with SP-imidazole 6 mM buffer. The cobalt column was successively washed with SP-imidazole 6 mM buffer, SP-imidazole 20 mM buffer. Elution was performed with SP-imidazole 200 mM buffer. The eluate was next dialyzed in BRB80 buffer, aliquoted, frozen in liquid nitrogen and stored at -80°C.

TIRF microscopy :

Perfusion chambers were prepared with functionalized silane-PEG (Creative PEGwork) glass slides. Slides and coverslips were first sonicated in acetone during 30 min then successively washed in acetone and ethanol 99% during 30 min each steps and rinsed with ultrapure water. Slides and coverslips were next treated with a solution of 2% hellmanex (Hellma) during 2-3 hours and washed in H₂O. They were next passived by sonication in a solution of KOH 1M. Slides were dried and incubated overnight at room temperature under gentle agitation in a solution of silane-PEG (30kDa, creative PEG-work) at 1mg/mL in ethanol and 0,02% HCl. Coverslips were dried and incubated overnight at room temperature in a solution silane-PEG-biotin (3,5 kDa, LaysanBio) at 1mg/mL in ethanol and 0,02% HCl. Slides and coverslips were next washed in EtOH 99% and ultrapure water, dried and stored at 4°C. Perfusion chambers were assembled between slides and coverslips using double adhesive tape face to form a flow chamber of a volume around 20 µL.

DIC microscopy

Slides and coverslips were successively washed in acetone and in pure ethanol before being rinsed with ultra pure water then dried. Perfusion chambers were assembled between slides and coverslips using double adhesive tape face to form a flow chambers of a volume around 20 µL.

Microtubule polymerization assay in DIC microscopy

The flow chamber was successively prepared by perfusion of BRB80 buffer, solution of axonemes in BRB80 buffer during 5min, BRB80 buffer with 1% casein and finally BRB80 buffer. Microtubules polymerization was initiated with 30 µM of tubulin free with or without 1 µM of MAP6-N. Perfusion were performed approximately after 10 min of polymerization with BRB80 buffer with or without 1 µM MAP6-N in order to induce microtubules dilution

and depolymerization. Samples were visualized on a BX51 fluorescence microscope with DIC (Olympus) equipped with a CCD camera (HAMAMATSU) 1344 x 1024 pixel imaging array with a U-CMAD3 camera adaptor (Olympus) coupled with a camera controller and image processor (HAMAMATSU), a warming plate HT200 (Minitüb), and controlled by Hokawo software (version 2.1, HAMAMATSU). Samples were observed using an PlanApo 60X oil immersion objective (Olympus). Time-lapse imaging was performed at 1 frame/5s during 1 hour.

Microtubule seeds preparation

Microtubule seeds were obtained by polymerizing 10 μ M tubulin (50% of biotinylated tubulin and 50% of ATTO-565 labeled tubulin) in the presence of 1mM GMPCPP in BRB80 buffer at 37°C for 1h. Microtubule seeds were then centrifuged for 5 min at 100 000xg, resuspended in an equal volume of BRB80 with 1mM GMPCPP and stored in liquid azote.

Microtubule polymerization in TIRF microscopy

The flow chamber was successively prepared by perfusion of a neutravidin solution (25 μ g/mL ; Pierce) in 1% BSA, PLL-g-PEG 2 kDa solution (0,1 mg/mL) (Jenkem) in 10 mM Hepes at pH 7.4, BSA 1% in BRB80 buffer and finally the microtubule seeds solution.

Microtubules polymerization were initiated with various concentration of tubulin free (10 to 20 μ M of tubulin free) (containing 30% of ATTO-565 labeled tubulin and 70% black tubulin) and with various concentration of MAP6 proteins in TIRF buffer (40 to 200 nM) (50 mM KCl, 4mM DTT, 1% BSA, 1 mg/mL glucose, 70 μ g/mL catalase, 600 μ g/mL glucose oxidase, and 0,02% methylcellulose (4 000 centipoise) in order to allow a low viscosity in the medium to perform the continuous vizualisation of microtubule growth inside the TIRF field in BRB80). Thickness of the TIRF field was settled to 100nm during the polymerization assay and settled to 50 to 500nm in order to reconstitute the helical microtubules. Samples were visualized on an inverted microscope (Eclipse Ti, Nikon) equipped with an ilas 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). Time-lapse imaging was performed at 1 frame per 5s with a 80 ms exposure time during 1 hour.

Microtubule reconstitution in TIRF microscopy:

Microtubules were polymerized between TIRF slide and coverslip with 10 μ M of free tubulin in presence of 150 nM of MAP6 during 1 hour at 37°C. Microtubule reconstitution was realized by modifying the laser incidence angle to increase the evanescent wavelength

thickness from 0 nm to widefield (>850 nm)

Deconvolution assay :

Microtubules polymerization were initiated between TIRF slide and coverslip with 10 μ M of free tubulin with 150 nM of MAP6 as described previously. Microtubules were fixed with 1% glutaraldehyde and observed by deconvolution on a epifluorescence microscope (Zeiss Axioskop 20) equipped with a high pressure mercury vapor lamp 50 W (Zeiss), a cooled charged-coupled device camera (Photometrics CoolSnap ES) with 1392 \times 1040-pixel imaging array (6,45 \times 6,45 μ m pixels), equipped with 2 shutter drivers (Uniblitz Model VMM-DL and D122, Vincent Associates). Acquisition were performed at 546 nm excitation during 100 ms, observed using a NeoFluar 100X oil immersion objective (ZEISS) and controlled by Metavue software (version 7.8.5.0, Molecular Devices). 3D deconvolution was realised with the Metamorph software (version 7.8.5.0, Molecular Devices).

Effect of GMP-CCP and GTP γ S :

Microtubule polymerization with 1 mM GMPCPP instead of GTP was realized in TIRF microscopy as described previously with 1 mM of free Tubulin to strongly reduce microtubule nucleation and with 15 or 150 nM of MAP6 as indicated. Microtubule polymerization with 1mM GTP γ S was realized in TIRF microscopy with 30 μ M Tubulin free and 150 nM of MAP6.

Microtubule interaction with EB1 protein

Microtubule polymerization was realized with 15 μ M Tubulin and 10 nM EB1 in presence or in absence of 150 nM of MAP6-N in BRB 80 buffer with 1 mM GTP. Acquisition was realized in dual view and treated with ImageJ software.

Analysis of microtubule structure

All image analysis was performed in Image J software.

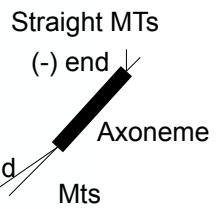
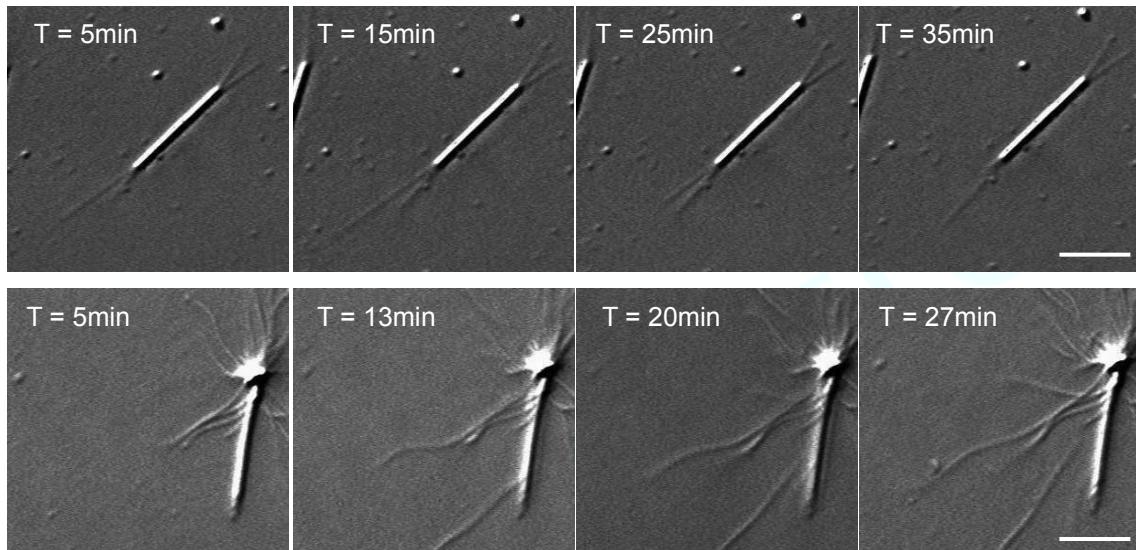
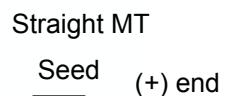
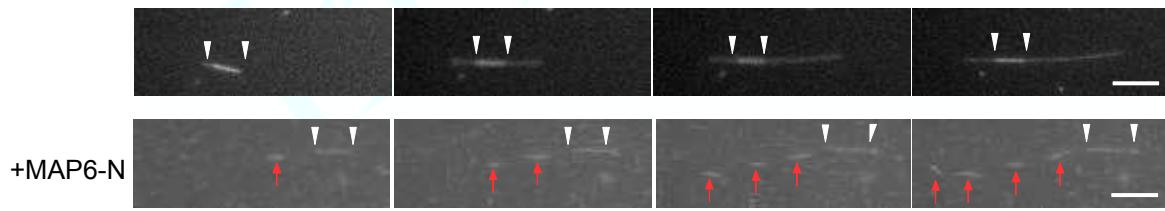
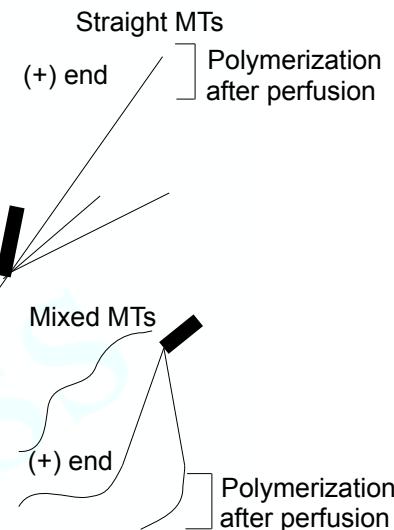
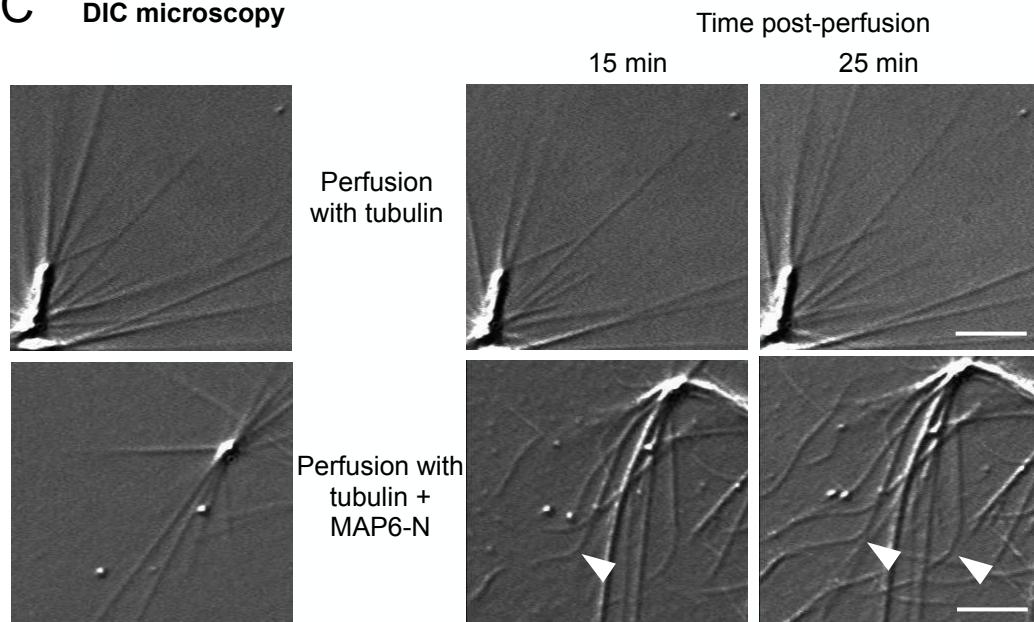
Results

MAP6 induces microtubule helical shape

Microtubules formed from tubulin dimers consist in a straight hollow tube of approximately 25nm in diameter. During the study of MAP6-N on microtubule dynamics we observed abnormal microtubules regarding their shape with curved rather than straight structures. Indeed, as shown Figure 1A, when observed by DIC microscopy, microtubules polymerized from axonemes exhibited a straight conformation whereas in the presence of MAP6-N at 1 μ M they adopted a wavy shape. We then performed experiments using TIRF microscopy in order to better visualize and analyse this phenomenon. Again, microtubules polymerized from microtubule seeds, exhibited a flat aspect in control conditions whereas in the presence of MAP6-N at 150 nM, microtubules exhibited a wavy shape appearing as dotted lines (Figure 1B). The physical properties underlining TIRF microscopy (evanescent wave) strongly suggest that the dotted aspect of microtubule obtained in the presence of MAP6-N was not a two dimensional structure but rather a three dimensional helical structure (Figure 1B).

Microtubule helical shape induced by MAP6-N required co-polymerization with tubulin

We next investigate the ability of MAP6-N to act on polymerised microtubules. Microtubules polymerised from axonemes were observed by DIC; then fresh medium containing free tubulin (15 μ M) with or without MAP6-N protein (1 μ M) was perfused. When the perfusion was done using free tubulin, straight microtubules remained straight (Figure 1C). In contrast, when the perfusion medium was containing MAP6-N, straight microtubules formed before perfusion, remained straight but continue to grow in a wavy shape (Figure 1C, arrows). Moreover, under these perfusion condition, newly formed microtubules exhibited a wavy shape (Figure 1C). These results clearly show that the formation of helical microtubules requires the presence of MAP6-N during the polymerisation phase and that MAP6-N did not modify the structure of a microtubule already polymerized.

A**DIC microscopy****TIRF microscopy****DIC microscopy****Figure 1 Effect of MAP6-N on microtubule structure**

(A) Real-time observation of the effect of MAP6-N on microtubule structure in DIC microscopy. Microtubules assembled on axonemes from a 10 μ M tubulin solution without or with MAP6-N (1 μ M) at several time points. Scal bar 5 μ m. (B) Real-time observation of the effect of MAP6-N on microtubule structure in TIRF microscopy at 150 nm field thickness. Microtubules assembled on seeds from a 10 μ M tubulin solution without or with MAP6-N (150 nM) at several time points. White arrows delineate seed extremities and red arrows the microtubules. Scale bar 5 μ m. (C) Effect of MAP6-N on the structure of preformed microtubules analyzed by DIC microscopy. Microtubules were polymerized on axonemes from a 10 μ M tubulin solution (left panels) and perfused with a 15 μ M tubulin solution (to maintain microtubule polymerization) containing or not MAP6-N protein (1 μ M). White arrows show the rupture in the microtubule structure with a straight growth before the perfusion and a curved growth after the perfusion with a medium containing MAP6-N. On the right: schematic representations of microtubules in the different conditions. Scale bar 5 μ m.

Microtubule helical shape induced by MAP6-N is counter clockwise

We next carefully analyse microtubules formed in the presence of MAP6-N by TIRF microscopy which allow to observe the bottom part of the helical microtubule with approximately 100 nm thickness. In this condition, we found that all the dots of microtubules were oriented on the right (Figure 2A). Quantifications performed on a large number of microtubules indicated that, when co-polymerised with MAP6-N protein, 100% of the microtubules exhibited a counter-clockwise helix with a pitch of approximately 4,5 μm (+/- 0,5 μm). We next investigated the effect of tubulin concentration on the pitch length. Varying tubulin concentration from 10 to 20 μM did not affect the helix pitch (Figure 2A).

By increasing the thickness of the TIRF field, we successfully managed to reconstitute the entirety of microtubule volume and determined that the thickness of the microtubule helix was between 750 nm and 1 μm (Figure 2B). To note, in the presence of MAP6, microtubule exhibited an helical shape but the overall directionality of the microtubule remained straight.

Microtubule helical shape induced by MAP6-N is concentration dependant

We next evaluated the relationship between MAP6-N concentration and its ability to induce microtubule helical shape. As shown in Figure 2B, MAP6-N is able to induce an helix shape around 150 nM; below this concentration microtubules remain in the classical conformation and around 200 nM MAP6-N induces microtubule nucleation as previously reported (Seggio et al. in preparation). In this last condition, microtubule did not polymerized with the helical shape, however during the first step of nucleation, it seems that microtubules started to polymerize in a helical conformation but rapidly readopted a flat aspect, phenomenon which could be explained by the rapid depletion of MAP6-N during the nucleation event (Figure 2B).

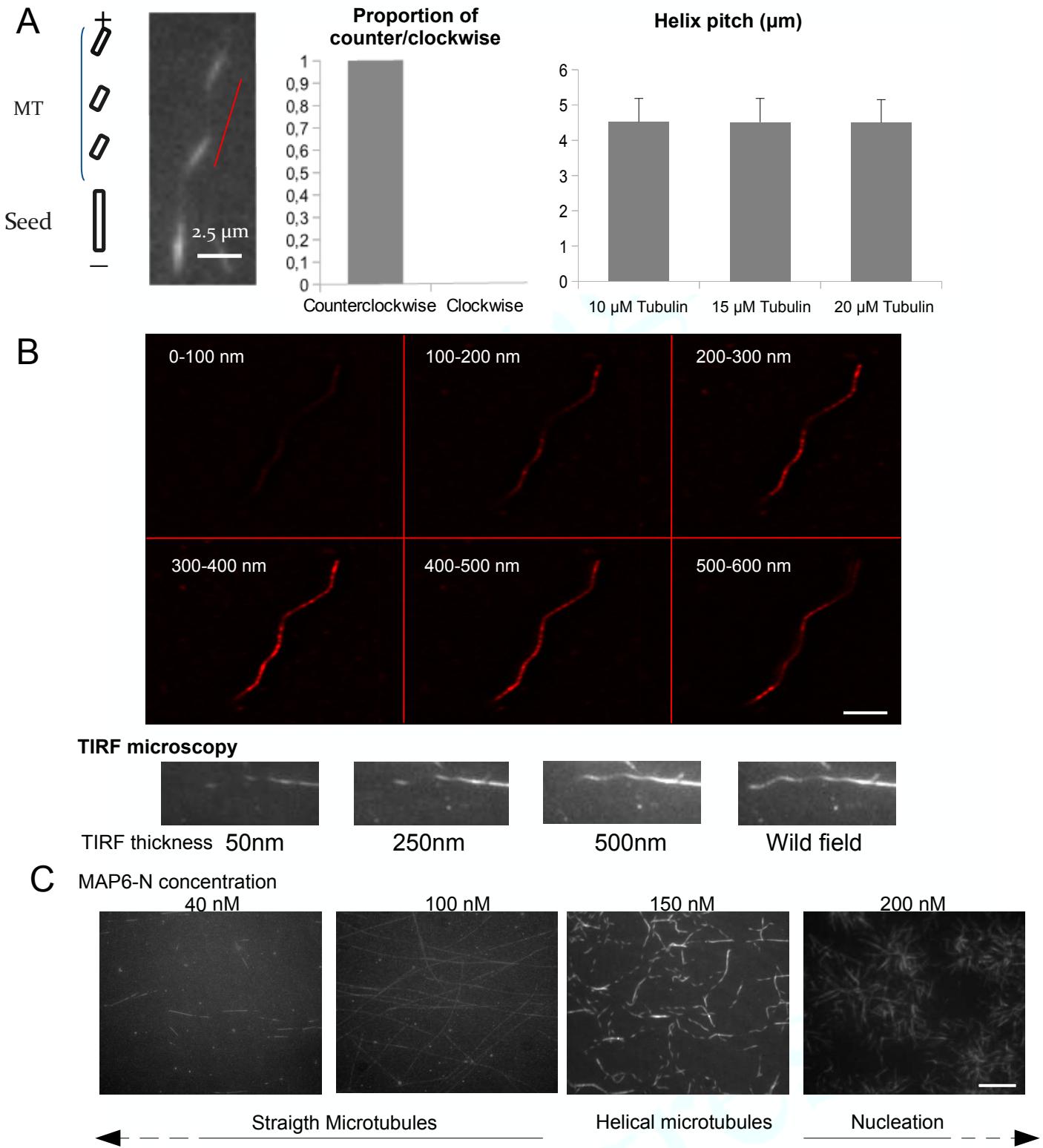


Figure 2 MAP6 induces helical shape microtubules

(A) Schematic representation in TIRF microscopy of a helical microtubule with a counter-clockwise helix. Proportion of counter-clockwise and clockwise helix on microtubule grown with MAP6-N at 150 nM with 10 μ M of tubulin. Quantification of the helix pitch (μ m) using TIRF microscopy depending of the tubulin concentration. (B) Image sequence of a helical microtubule at different TIRF thickness field in order to reconstitute the whole microtubule. Scale bar 5 μ m. (C) Picture of TIRF microscopy displaying the effect of the MAP6-N concentration on the microtubule structure (10 μ M free tubulin). Scale bar 20 μ m.

Microtubule helical shape induced by MAP6-N is dependent on GTP hydrolysis

We then determine if the hydrolysis of the GTP was necessary to induce the torsion by using two non hydrolysable analogs of GTP, GMPCPP and GTP γ s. GMPCPP analog behaves as a very strong nucleation factor necessitating to work at a very low concentration of tubulin. When we used 1 μ M of tubulin and MAP6-N at 150 nM (a concentration able to curve microtubules at 10 μ M GTP-tubulin); nucleation was low and microtubules polymerized with the classical structure (Figure 3A, panel b). When experiments were performed with GMPCPP-tubulin at 1 μ M and MAP6-N at 15 nM (to keep the same ratio between free tubulin and MAP6-N) we still obtained non-curved microtubules (Figure 3A, panel c). Similar experiments were realized with 30 μ M of tubulin and MAP6-N at 150 nM in the presence of GTP γ s and again microtubules polymerized with a non-helical conformation (Figure 3A, panel d). Altogether these results strongly suggest that the hydrolysis of the GTP is required to induce the helical conformation observed in the presence of MAP6-N.

MAP6-N ability to induce microtubule helical shape required large part of the protein

Using different constructions of the MAP6-N protein we next tried to determine which part of the protein was necessary to induce the microtubule torsion. We used several deletion mutants of MAP6-N (Table S1) and found that, except the construct deleted for the microtubule binding domain, Mn3, all constructs failed to induce microtubule helical shape. These results indicate that parts of MAP6-N are not sufficient to induce the helical shape and that several parts of MAP6-N might be involved in its ability to deform microtubules.

MAP6-N action on microtubule structure did not modify microtubule + end structure

We next examine the relationship between MAP6-N action on microtubule structure and the structure/behaviour of the plus (+) end, the growing extremity of the microtubule. For that, we monitored the behaviour of the +TIP protein, EB1. Microtubules were polymerised in the presence of MAP6-N and the ability of EB1 to interacted with microtubules + ends was monitored, by TIRF microscopy. As shown Figure 3B, EB1 nicely decorated helical microtubules (+) ends and did not seem to alter significantly the overall microtubule dynamics. This result strongly suggests that microtubule (+) ends and microtubule sheet structure were not dramatically affected by MAP6-N.

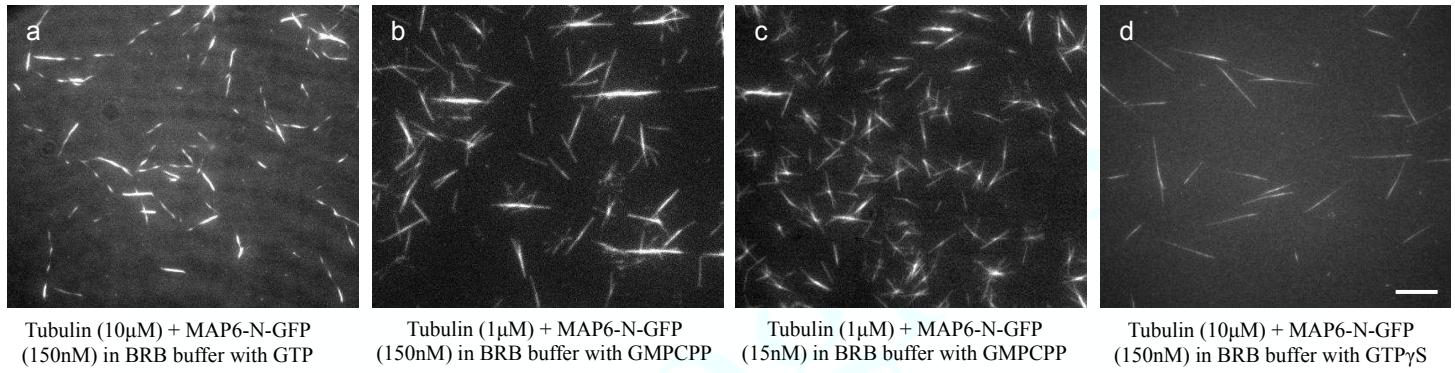
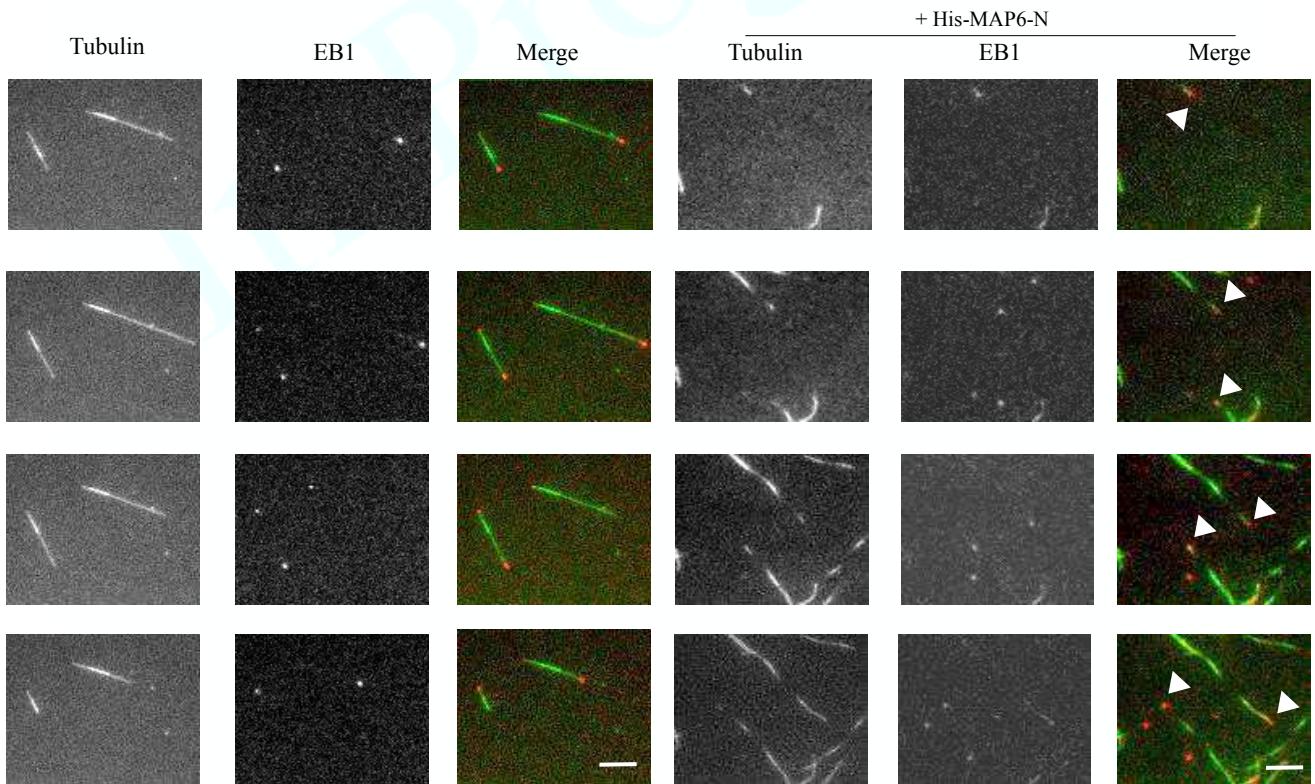
A**B**

Figure 3 GTP hydrolysis is required for the formation of helical microtubules which bind normally to EB1

(A) Effect of GTP hydrolysis on microtubules structure in the presence of MAP6-N. Images of microtubules in TIRF microscopy polymerized with GTP or with non-hydrolysable GTP analogs : the GMPCPP and GTP γ S. With 15 μ M Tubulin and 150 nM of MAP6-N in presence of 1 mM GTP microtubules adopted a helical conformation and appeared as dot line (panel a). In the presence of 1 μ M Tubulin (to reduce microtubule nucleation), 150 nM or 15 nM MAP6 (to keep a ratio similar to control conditions) and 1 mM GMPCPP , microtubules remained in a non helical configuration (panel b and c respectively). In presence of 15 μ M Tubulin, 150 nM MAP6 and 1mM GTP γ S the microtubules also remained in a non helical configuration (panel d). Scale bar 15 μ m.

(B) Interaction of EB1 protein with microtubule (+) ends. Images sequence of microtubules, observed in TIRF microscopy, polymerizing with 15 μ M Tubulin and 10 nM EB1 in absence (left panels) or in presence of 150 nM MAP6-N (right panels). From left to right : Tubulin, EB1, merge). White arrows indicate the position of the EB1 comets. Scale bar 5 μ m.

Discussion

Microtubules are, because of their intrinsic structure, the most rigid, straight element of the cytoskeleton in the eukaryotic cells. In this study, using purified proteins, we demonstrated that MAP6 proteins exert a strong effect on the structure of the microtubules. Indeed, in presence of MAP6, microtubules lost their classical aspect to adopt a totally new conformation, an helical conformation. This effect is observable in TIRF microscopy when the concentration of MAP6-N is comprised between 100 nM and 250 nM. However, the effect of MAP6 on the microtubule structure could be present over 250 nM. Indeed, at this concentration, MAP6 promotes microtubule nucleation making difficult a global view of the microtubules. A close examination of microtubules during the the nucleation step indicated that they first grow with an helical shape which rapidly switch to a straight conformation, probably due to a strong depletion of MAP6 from the reaction mixture, following the intense microtubule nucleation.

The effect of MAP6 on microtubule structure is only observed during microtubule polymerisation suggesting an effect of MAP6 during microtubules closure or on the microtubule sheet, the structure of growing microtubules (+) ends. However we showed that the microtubule + Tips protein EB1, was still able to correctly interact with the extremity of helical microtubules, suggesting that helical microtubule (+) ends display a correct structure. These results are not in favour of microtubules expansion or closure defects that might have been induced by MAP6. Moreover, an increase of tubulin concentration is known to induce microtubules defects and in our experiments an increase of tubulin concentration did not change the shape nor the pitch of the helix. These results indicate that MAP6 effect on microtubule structure is independent of the polymerization growth rate and again are not in favour of the formation of an helical shape in response to microtubule defects. Rather, all these results suggest that MAP6 induce microtubule helical shape not by making defects during the polymerisation phase but rather by acting on the microtubule organisation all along the lattice. In favour of this hypothesis, is the proportion of the counter-clockwise helix (100%) suggesting that the formation of the helix and the conservation of the pitch was not made randomly.

In order to explain how MAP6 can induce the modification of the microtubule structure, several hypothesis can be proposed. MAP6 protein might induce a sliding of the protofilaments all along the microtubule lattice resulting in the formation of an helix.

Another hypothesis would be that MAP6 binding on microtubule induce constraints on the microtubule forcing its polymerization in an helical way. This hypothesis requires that MAP6 effect takes place on an asymmetric structure inside the microtubule, i.e. on the microtubule sheet. Indeed a binding of MAP6 all along the lattice will nullify the constraints. MAP6

binding to the microtubule sheet might stabilize its outside bending, at the opposite of the lattice closure place. In this condition, the new protofilaments, formed during the polymerization, will not be able to straighten the microtubule to allow a straight closure forcing the microtubule to follow the native curvature of the sheet. In the case of microtubule with 14:3 protofilaments, the microtubule lattice is oriented to the left and if this hypothesis is right a counter-clockwise helical microtubule is expected (in agreement with or experimental data).

Our data also suggest an important role of the hydrolysis of the GTP in the formation of the helix. Tubulin-GTP has been reported to be in a more straight shape than the tubulin-GDP and the energy generated by GTP hydrolysis could be important to allow the curvature of the microtubule to induce the helix.

Another question will be to determine if the helical structure induced by MAP6 will remain stable if MAP6 is subsequently removed from the polymerised microtubules, such an experiment is not feasible as we have no simple way to remove MAP6 from microtubules after the polymerisation step.

In this study, we present first evidence that the well-known and admitted straight microtubule structure might not be the only structure that microtubules can adopt with the possibility to form an helix. We still need to investigate the physical properties of this new structure (rigidity, organisation, etc) but also the physiological role of this new microtubules population.

Indeed, the most intriguing aspect of our results is to try to identify a physiological role of such helical microtubules, in neurons. Helical microtubules might be unable to form bundles in neurons and might provide neurons with single microtubules to achieve particular functions such as spines entry. Indeed, in neurons, some microtubules were shown to quit the axon shaft to transiently enter inside the dendritic spines (Jaworski et al., 2009). These dynamic microtubules, able to explore spines, are most probably different from the ones, more stable, present in the shaft where they enable axonal trafficking, for example.

The helical structure could also play a more mechanistic role of protection against for example crushing injury on the axon by absorbing some of the force.

Interestingly, the thickness of the helix is between 750 nM to 1 μ m, which is compatible with the size of an axon or of a dendritic spines neck. High resolution imaging of axons have recently revealed unsuspected actin rings linked with spectrin fibers; it will be of definite interest to examine if helical microtubules might be present in axons to sustain the precise axonal diameter (Xu et al., 2013).

Bosc, C., J.D. Cronk, F. Pirollet, D.M. Watterson, J. Haiech, D. Job, and R.L. Margolis. 1996. Cloning, expression, and properties of the microtubule-stabilizing protein STOP. Proc Natl Acad Sci U S A. 93:2125-2130.

Bosc, C., R. Frank, E. Denarier, M. Ronjat, A. Schweitzer, J. Wehland, and D. Job. 2001. Identification of novel bifunctional calmodulin-binding and microtubule-stabilizing motifs in STOP proteins. J Biol Chem. 276:30904-30913.

Denarier, E., A. Fourest-Lievin, C. Bosc, F. Pirollet, A. Chapel, R.L. Margolis, and D. Job. 1998. Nonneuronal isoforms of STOP protein are responsible for microtubule cold stability in mammalian fibroblasts. Proc Natl Acad Sci U S A. 95:6055-6060.

Dye, R.B., Fink, S.P., and Williams, R.C. (1993). Taxol-induced flexibility of microtubules and its reversal by MAP-2 and Tau. J. Biol. Chem. 268, 6847–6850.

Elie, A., Prezel, E., Guérin, C., Denarier, E., Ramirez-Rios, S., Serre, L., Andrieux, A., Fourest-Lievin, A., Blanchoin, L., and Arnal, I. (2015). Tau co-organizes dynamic microtubule and actin networks. Sci Rep 5, 9964.

Felgner, H., Frank, R., Biernat, J., Mandelkow, E.M., Mandelkow, E., Ludin, B., Matus, A., and Schliwa, M. (1997). Domains of neuronal microtubule-associated proteins and flexural rigidity of microtubules. J. Cell Biol. 138, 1067–1075.

Guillaud, L., C. Bosc, A. Fourest-Lievin, E. Denarier, F. Pirollet, L. Lafanechere, and D. Job. 1998. STOP proteins are responsible for the high degree of microtubule stabilization observed in neuronal cells. J Cell Biol. 142:167-179.

Jaworski, J., L.C. Kapitein, S.M. Gouveia, B.R. Dortland, P.S. Wulf, I. Grigoriev, P. Camera, S.A. Spangler, P. Di Stefano, J. Demmers, H. Krugers, P. Defilippi, A. Akhmanova, and C.C. Hoogenraad. (2009). Dynamic microtubules regulate dendritic spine morphology and synaptic plasticity. Neuron. 61:85-100.

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.

Mickey, B., and Howard, J. (1995). Rigidity of microtubules is increased by stabilizing agents. J. Cell Biol. 130, 909–917.

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.

Xu, K., Zhing, G., Zhuang, X. (2013). Actin, spectrin and associated proteins form a periodic cytoskeletal structure in axons. Science. 25 :452-456

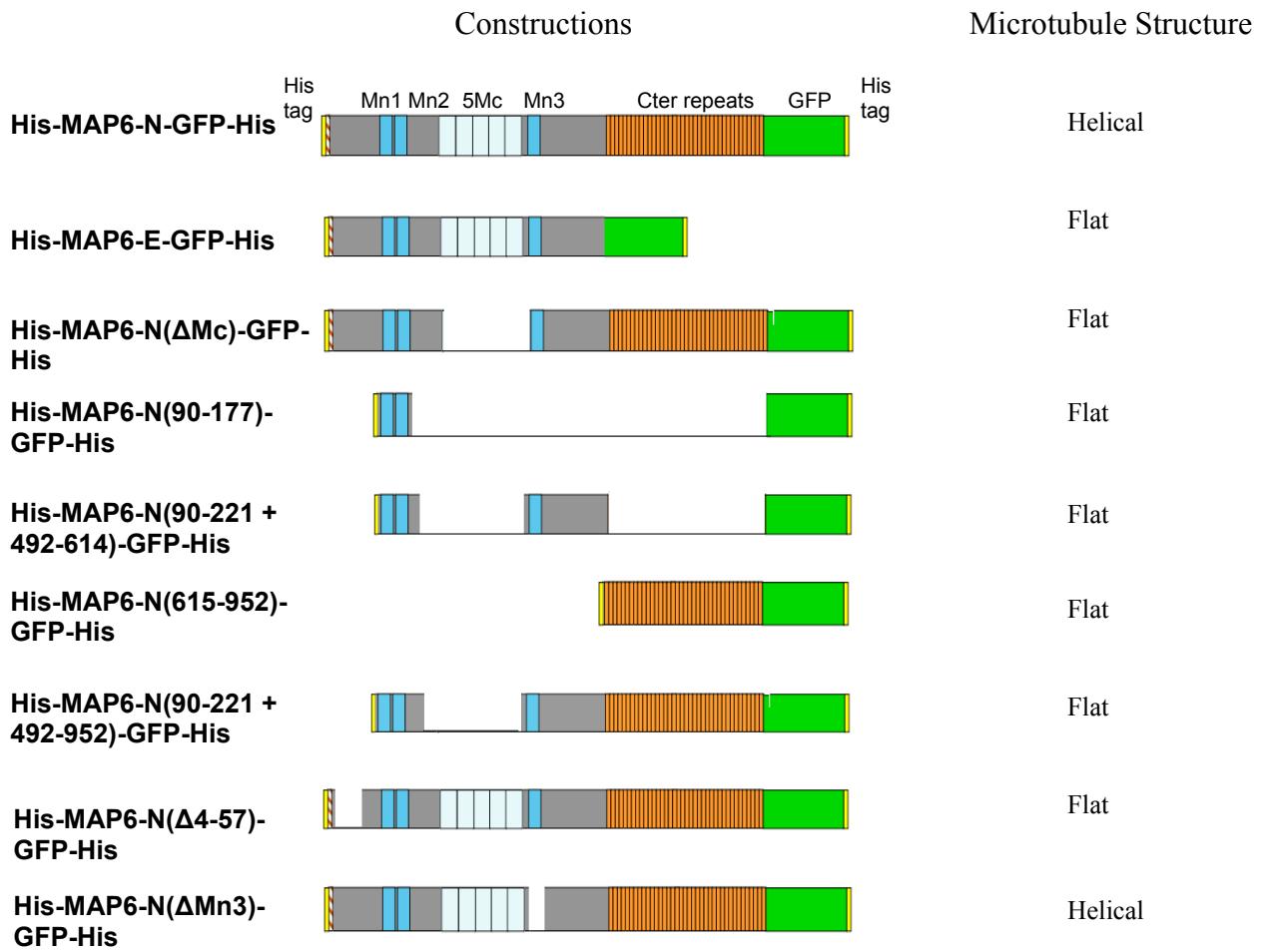


Table S1 : Schematic representation of the different constructions and their ability to induce microtubule helical shape.

Résultats Actine

Rôle des protéines MAP6 sur les réseaux d'actine: étude *in vitro*

Contexte

L'actine constitue avec les microtubules l'un des constituants majeurs du cytosquelette des cellules eucaryotes et va se retrouver impliquée dans de nombreux processus de motilité cellulaire comme la mise en place de structure comme les lamellipodes ou encore les filopodes. L'actine va ainsi jouer par exemple un rôle important dans la mise en place et la guidance du cône de croissance dans les cellules neuronales lors du développement.

Cependant, l'actine peut également jouer un rôle dans le maintien de certaines structures, comme par exemple les épines dendritiques (Ramon et al., 1888). Les épines dendritiques constituent des excroissances de la membrane des dendrites dans les neurones pouvant aller de 1 à 2 μm délimitées à leur base au niveau du dendrite par un rétrécissement de la membrane plasmique constituant le cou de l'épine dendritique. Cette structure particulière leur permettent de jouer un rôle important dans la transmission synaptique en recevant les signaux cellulaires des axones de neurones présynaptiques mais également un rôle de compartimentation et de régulation de cette transmission au niveau du cou de l'épine dendritique (Araya et al., 2006).

Bien que longtemps considérée comme figée rapidement après la naissance, les épines dendritiques témoignent au contraire d'une grande plasticité structurale, plasticité qui va jouer un rôle prépondérant au cours de l'apprentissage. Il a ainsi été montré que les épines dendritiques subissent continuellement des changements de forme et des *turn-over* permanents (Matsuzaki et al., 2004 ; Toni et al., 1999 ; Segal, 2005). Cette plasticité est influencée par l'activité neuronale mais également augmentée lors d'expériences de potentialisation à long terme (LTP) consistant en l'augmentation de l'efficacité synaptique après une stimulation importante des régions présynaptiques (Holtmaat et al., 2006 ; De Roo et al., 2008 a ; De Roo et al., 2008 b), plasticité médiée entre autre par un remodelage des filaments d'actine. L'actine va ainsi avoir à la fois un rôle dans le maintien de la structure des épines mais également dans la plasticité de ces dernières (Fischer et al., 1998).

De façon intéressante, des altérations de la structure des épines dendritiques ou encore de leur dynamicité ont été mis en évidence dans les phases précoces des maladies neurodégénératives comme la maladie d'Alzheimer ou la maladie de Parkinson mais aussi dans les maladies psychiatriques comme l'autisme ou la schizophrénie. Ces défauts de fonctionnement des épines dendritiques sous-tendent les troubles cognitifs (apprentissage, mémoire), symptômes communs à ensemble de ces maladies neuronales (Fuhrmann et al., 2007 ; Toro et al., 2010 ; Blanpied and

Ehlers, 2004 ; Kasai et al., 2010 ; Melom and Littleton, 2011 ; Wong et Guo, 2013).

Comme nous l'avons vu précédemment, il a été montré chez des souris KO pour MAP6 que la perte de la protéine entraînait des troubles comportementaux accompagnés de sévères défauts de plasticité synaptique (Andrieux et al., 2002). De plus le spectre des déficits présents chez la souris MAP6 KO ainsi que leur réactivités aux antipsychotiques permettent de proposer ce modèle animal comme un modèle utile pour l'étude de la schizophrénie.

Dans ce contexte nous nous sommes demandé au sein du laboratoire si les défauts observés dans les souris KO MAP6 pouvaient impliquer, comme dans le cas des maladies psychiatriques une altération de la morphologie et/ou de la dynamicité des épines dendritiques.

Ainsi, des études réalisées au sein du laboratoire par Leticia Peris et Mariano Bisbal sur des neurones primaires d'hippocampe de souris en culture ont montré que la délétion de la protéine MAP6 dans ces neurones entraîne une perte significative de la densité d'épines dendritiques à la surface du neurone. De la même façon, l'utilisation d'ARNs anti-sens dirigés contre la protéine MAP6 engendre une diminution de cette densité. De plus, des expériences d'activation des neurones (LTP chimique) ont montré que l'absence de la protéine MAP6 entraîne une perte de la stabilisation de l'actine, dans les épines en réponse à la LTP. En accord avec ces résultats, la ré-expression de la protéine MAP6 dans des neurones déplétés pour la protéine permettait un rétablissement de la densité d'épines au même niveau que le contrôle ainsi que le rétablissement de la stabilité de l'actine dans les épines en réponse, à une LTP chimique.

Ainsi dans le cas de la souris KO MAP6, les défauts observés semblent impliquer, comme pour les autres maladies et pathologies décrites précédemment, des altérations de la stabilité et de la dynamicité des épines dendritiques.

De façon à déterminer quelles régions de la protéine pouvaient être impliquées dans le phénotype observé, de nombreuses constructions ont été testées sur ces neurones afin de rétablir la densité d'épines. De façon surprenante, il a ainsi été montré que la région centrale de la protéine MAP6, contenant les domaines de liaisons aux microtubules au froid (modules Mc), permettait un rétablissement du phénotype.

Lorsque le cDNA codant pour les modules Mc de MAP6 a été transfecté dans des cellules Hela (dépourvue de MAP6) nous avons eu la surprise de voir une co-localisation avec l'actine. La caractérisation d'une éventuelle interaction directe entre ces modules Mc et l'actine a été entreprise.

Résultats

Dans un premier temps, nous avons testé une possible interaction directe de la protéine MAP6 avec l'actine *in vitro* en pellet assay. Nous avons ainsi montré que la protéine MAP6-N pouvait interagir de façon directe avec les filaments d'actine. L'interaction des modules Mc avec l'actine semble être beaucoup moins forte que celle de la protéine entière (figure 1). Toutefois, une centrifugation à plus faible vitesse (15 000g au lieu de 100 000g) après l'interaction des protéines avec l'actine a permis de montrer que la protéine MAP6-N ainsi que les modules Mc étaient capables d'induire la formation de faisceaux d'actines (qui ne peuvent pas se former uniquement avec de l'actine G) montrant également la capacité des modules Mc à interagir avec l'actine pour former des faisceaux. De façon à quantifier la formation de ces faisceaux, diverses concentrations de Mc ont été appliqués à l'actine filamenteuse. La formation de ces faisceaux semble ainsi atteindre un plateau à partir d'une certaine concentration de MAP-N (221-445) (environ 250 à 500 nM pour 2 µM d'actine G) (figure 2).

Afin de nous assurer que l'actine dans le culot obtenue à 15000 g correspond bien à de l'actine en faisceau et non à une agrégation de filaments d'actine, nous avons par la suite regardé la polymérisation de l'actine G en TIRF en présence ou en absence des modules Mc (MAP6-N 221-445). Ainsi en absence des modules Mc, l'actine polymérise, reste labile dans le champ du TIRF et les filaments ne s'associent pas pour former des faisceaux. Au contraire, la présence des modules Mc induit la formation de faisceaux, indiquant que les modules Mc sont capables d'interagir avec les filaments d'actine pour les assembler en faisceaux.

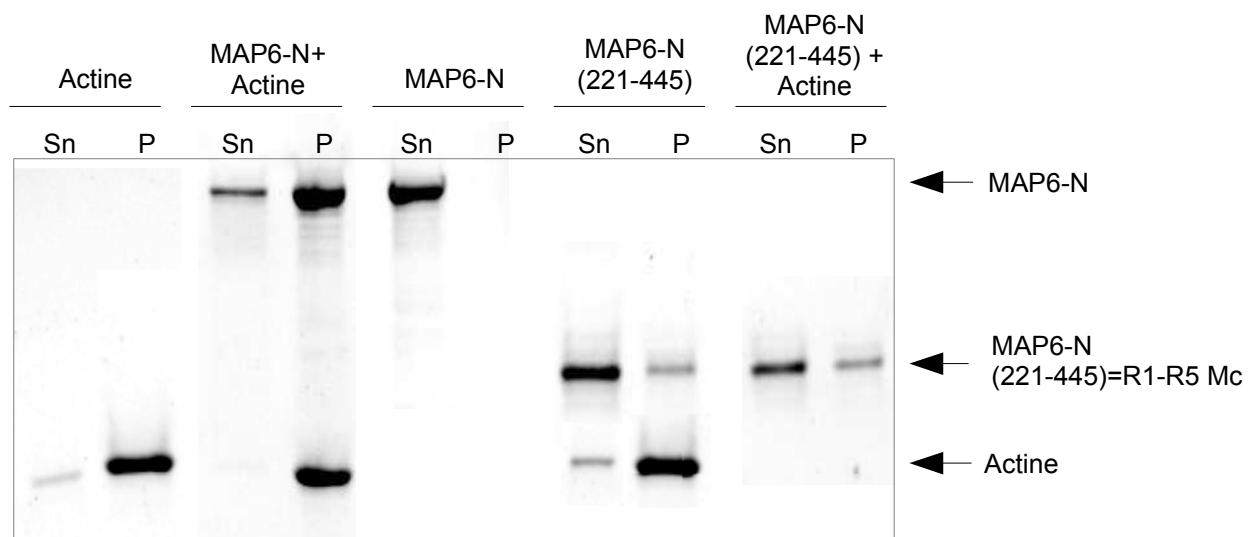
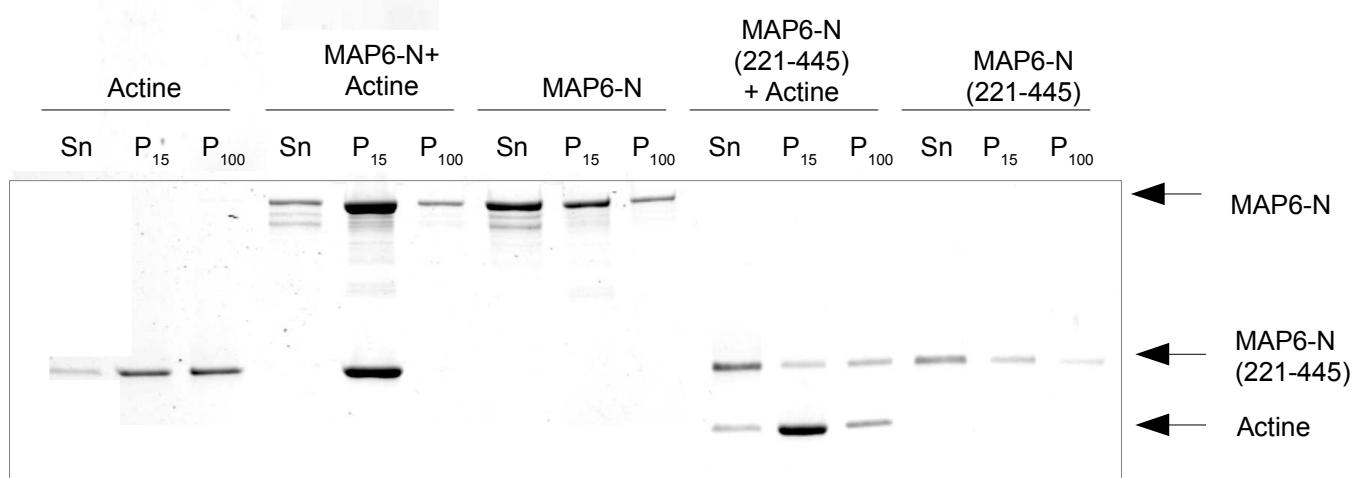
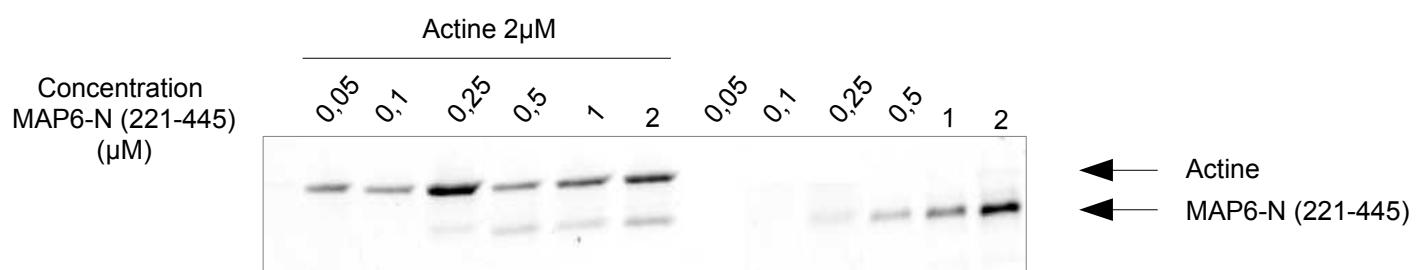
A**B**

Figure 1 : Interaction des protéines MAP6-N et MAP6-N (221-445) avec les filaments d'actine

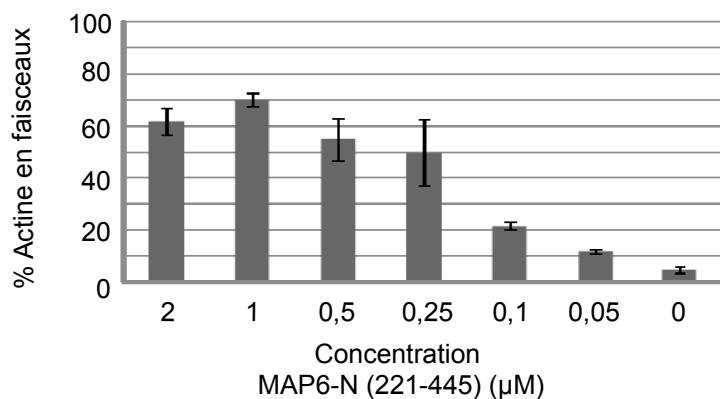
Les filaments d'actine ont été prépolymérisés avec 2µM d'actine G puis mis à incuber avec ou sans les différentes protéines MAP6-N et MAP6-N(221-445) à 1µM, puis centrifugés. (A) Les filaments d'actine ont dans un premier temps étaient centrifugés à 100 000g et les surnageants (Sn) et culot (P) déposés sur gel afin de mettre en évidence une interaction directe entre les filaments et les protéines. (B) Dans un second temps les filaments ont été successivement centrifugés à 15 000g (P₁₅) pour centrifuger uniquement les faisceaux d'actine puis à 100 000g (P₁₀₀) pour centrifuger les filaments simples.

De façon intéressante, les modules Mc furent initialement décrits comme étant capable de lier et de stabiliser les microtubules au froid et sont incapables de lier les microtubules à 37°C.

A



B



C

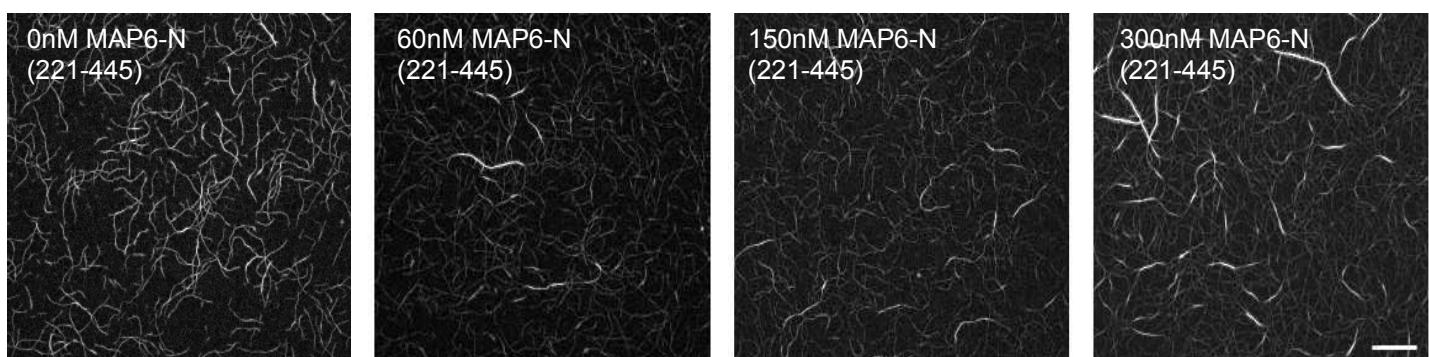


Figure 2 : Activité de formation de faisceaux par la protéine MAP6-N (221-445)

(A) Les filaments d'actine ont été prépolymérisés et incubés avec différentes concentrations de MAP6-N (221-445) avant d'être centrifugés à 15 000g. Les culots ont ensuite été déposés sur gel acrylamide 10% (partie gauche du gel). La concentration totale de MAP6-N (221-445) (M_c) utilisée pour chaque condition lors de l'incubation a été déposée sur la partie droite du gel. La quantité d'actine centrifugée à par la suite était rapportée à la quantité d'actine G initiale (en utilisant le logiciel Image J) pour déterminer le pourcentage d'actine en faisceaux (B). Le graphique représente la valeur moyenne et les barres d'erreurs la déviation standard d'au moins 4 expériences différentes. (C) Image en microscopie TIRF représentant l'aspect des filaments d'actine en présence de concentrations croissantes de MAP6-N (221-445).

De plus, le nombre de répétitions des modules Mc au sein des espèces peut varier de 1 pour l'homme à 9 pour certains rongeurs et il existe une corrélation entre le nombre de modules Mc et la capacité à faire de la torpeur ou à hiberner (Delphin et al., 2012). Un seul domaine Mc n'est pas capable de stabiliser les microtubules au froid (Bosc et al., 2001)

Ainsi, le rat possède 5 modules Mc au sein de la protéine MAP6 tandis que chez l'homme, seul le dernier module Mc, appelé R5, est présent. De plus ce module se retrouve être une répétition légèrement dégénérée par rapport aux 4 autres modules chez le rat. Nous nous sommes ainsi demandé si un seul module Mc était capable d'interagir avec l'actine pour former des faisceaux ou si deux modules étaient nécessaires pour faire le lien entre deux filaments d'actine.

Ainsi une expérience de pellet assay a été réalisée avec la protéine MAP6-N(360-451), exprimant les modules R4R5 ou avec la protéine MAP6-N(157-202) exprimant seulement le module R5. Nous avons ainsi pu montrer que 2 modules Mc sont toujours capables de former des faisceaux d'actines et de façon intéressante, le module R5 est également capable de former des faisceaux. La formation des faisceaux ne passerait donc pas par une répartition des modules Mc entre les filaments d'actine mais soit par une capacité de chaque module Mc à lier plusieurs filaments d'actine ou bien par une interaction entre les différents modules Mc.

Le module R5 est présent chez l'homme indiquant que l'effet de MAP6 sur l'actine au sein des épines est probablement un mécanisme également actif chez l'homme.

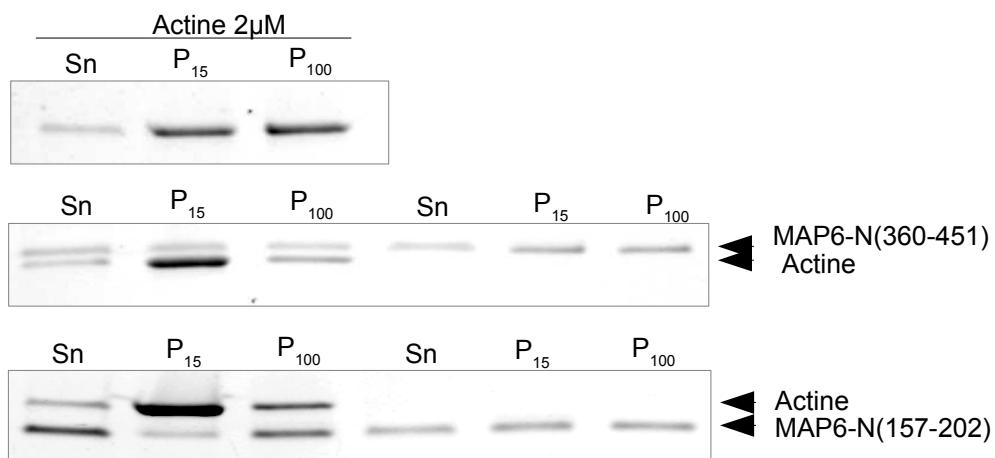


Figure 3 : Activité de formation de faisceaux d'actine par les protéines MAP6-N(360-451) et MAP6-N(157-202).
Les filaments d'actine ont été prépolymérisés avec $2\mu M$ d'actine G puis mise à incuber avec ou sans les différentes protéines MAP6-N(360-451) et MAP6-N(157-202) à $1\mu M$, puis centrifugés. Les filaments ont été successivement centrifugés à $15\ 000g$ (P_{15}) pour centrifuger uniquement les faisceaux d'actine afin de mettre en évidence une capacité de formation de faisceaux des protéines, puis à $100\ 000g$ (P_{100}) pour centrifuger les filaments simples.

Conclusion

La protéine MAP6 semble donc être un acteur majeur de la régulation de l'actine et des études complémentaires détermineront le rôle exact de la protéine MAP6-N sur l'ensemble des aspects de cette dynamique (nucléation, bundling, stabilisation). De plus les régulateurs de l'actine comme la profiline contiennent des domaines SH3 qui lient de nombreux domaines PRD, la protéine MAP6 contenant plusieurs PRD on peut imaginer, en sus des régulations directes identifiées ici, des régulations indirectes de la dynamique de l'actine, par MAP6.

Matériel et méthode Actine :

Purification de l'Actine et de la profiline:

L'actine G a été purifiée à partir de muscle squelettique de lapin et marquée avec l'Alexa-568 comme décrit dans le papier de Reymann et al., 2011.

Clonage des plasmides

La protéine His-MAP6-N-GFP-His correspondant aux acides aminés numéro 1 à 952 de la protéine d'après la référence de la protéine de rat MAP6-N numéro NP_058900 a été clonée dans le plasmide pFastBac-Htb.

Les protéines His-GFP-MAP6-N(221-445)-His, His-GFP-MAP6-N(360-451)-His correspondent respectivement à la protéine MAP6-N de rat (référence NP_058900) des acides aminés numéro 221 à 445 et 360 à 451. Pour chacune de ces constructions le tag GFP se situe en partie N-terminale de la protéine.

La protéine His-GFP-MAP6-N(157-202)-His correspond quant-à-elle aux acide aminés 157 à 202 de la protéine MAP6-N de souris (référence NP_034967).

Production du Bacmid

La production du Bacmid a était réalisée dans les bactéries DH10BAC.

0,4 µL de chacune des constructions d'ADN décrites précédemment ont été déposées sur les bactéries. Ces dernières ont par la suite étaient mises sur la glace pendant 30 min puis chauffées dans un bain marie à 42°C pendant 50 sec et remises sur la glace pendant 2 min. Elles ont ensuite été diluée dans 800 µL de SOC buffer pendant 4h à 37° (Thermofischer) sous agitation avant d'étaler sur 20 µL de bactéries sur une boite de pétri LB (avec de la kanamycine (50mg/mL) + gentamycine (10mg/mL) + tetracycline (10mg/mL) + IPTG (200µg/mL) + Xgal (100µg/mL)) et incubées sur la nuit à 24°. Les colonies ayant poussées ont ensuite été prélevées et resuspendues dans 14mL de milieu LB avec les antibiotiques précédent pendant 24 sous agitation à 37°.

La Miniprep des différents bacmids a été réalisée en utilisant le kit de purification de plasmide d'ADN de Macherey-Nagel.

Transformation des cellules d'insectes SF9 and production du virus

20µL d'ADN de Bacmid a ensuite été dilué dans 180µL d'eau ultrapure et 7µL de Fugen HD (Thermofischer) et incubé 5 min à température ambiante. Le bacmid a ensuite été déposé sur les cellules d'insectes SF9 dans des flasque de culture T25 (Greiner bio-one) à environ 30% confluence

dans 2mL de milieu SF 900-III (Thermofischer) en absence de gentamycine et incubé à 37°C pendant 72h. 24H après ajout du bacmid, le milieu de culture a été complémenté avec 3mL de milieu de culture SF 900-III avec gentamycine (10mg/mL). Après 72h d'infection, la production du virus a été amplifiée en ajoutant 1,5mL du milieu de culture infecté de la flasque de culture T25 sur des cellules SF9 à environ 30% confluence dans 15mL de milieu de culture SF 900-III dans une flasque de culture T75 avec genamycine (10mg/mL). Après 72h, les cellules sont centrifugées à 2 000g pendant 5 min, le surnageant a été récupéré, congelé dans l'azote liquide et conservé à -80°C.

Production des protéines dans les cellules d'insectes Hi5

Des cellules d'insectes Hi5 à 10^6 cellules/mL dans du milieu de culture express5 (Thermofischer) avec 10mg/mL de gentamycine, 20mM L glutamine et 0,25mg/mL de fongizone ont par la suite été infectées avec les différents virus présent dans le milieu de culture des cellules SF9 contaminées en ajoutant environ 5 à 10% du volume final du milieu de culture des cellules Hi5. Ces dernières ont ensuite été incubées pendant 48h à 37°C. Les cellules Hi5 ont par la suite été centrifugées à 2 000g pendant 5min, le surnageant a été récupéré, congelé dans l'azote liquide et conservé à -80°C.

Purification de la protéine His-MAP6-N-GFP-His

A partir de 50mL de cellules d'insectes infectées Hi5, le culot a été resuspendu dans 5mL de tampon de lyse (0,5M Arginine ; 50mM Hepes pH7,4 ; 1mM EGTA/EDTA ; 1 tablette d'inhibiteur de protéase (Roche)). Les cellules ont ensuite été centrifugées à 150 000g pendant 30 min à 4°C et le surnageant a été dilué dans dix fois son volume dans le tampon de dilution (Hepes 50mM pH7,4 ; NaCl 100mM ; 0,1% Triton ; 1mM EGTA/EDTA) puis centrifugé une nouvelle fois à 150 000g pendant 30 min à 4°C.

Le surnageant a ensuite été déposé sur 4mL d'une colonne de Q sepharose préalablement équilibrée (Hepes 50mM pH7,4 ; NaCl 150mM ; 0,05% Triton). Le surnageant passé à travers la colonne ainsi que 3 fois le volume de colonne lavée avec du tampon d'équilibration a été récupérés et déposé sur 5mL de colonne de SP sepharose préalablement équilibré (Hepes 50mM pH7,4 ; NaCl 150mM ; 0,05% Triton). La colonne a ensuite été lavée avec le même tampon et éluée avec 5 fois le volume de colonne avec du tampon d'élution (Hepes 50mM pH7,4 ; NaCl 400mM ; 0,05% Triton). L'éluat plus 6mM d'imidazole a ensuite été déposé sur 2mL de colonne de Cobalt (équilibrée avec Hepes 50mM pH7,4 ; NaCl 400mM ; 0,05% Triton ; 6mM Imidazole). Le surnageant a ensuite été déposé sur une colonne de Cobalt préalablement équilibré (Hepes 50mM ; NaCl 400mM ; 0,02% Triton ; 20mM Imidazol). La colonne a ensuite été successivement lavée avec le même tampon d'équilibration mais avec 20 puis 40mM Imidazole. L'élution a été réalisée avec 200mM Imidazol.

L'éluat a ensuite été dialysé (Slide-A-Lyzer Dialysis Cassette ThermoScientific) dans du BRB80 KCl (80mM Pipes ; 1mM EGTA ; 1mM MgCl₂ ; 50mM KCl pH6,9), aliquoté, plongé dans l'azote liquide et conservé à -80°C.

Purification des protéines His-MAP6-N(221-455)-GFP-His / His-MAP6-N(360-451)-GFP-His / His-MAP6-N(157-202)-GFP-His

A partir de 50mL de cellules d'insectes infectées Hi5, le culot a été resuspendu dans 5mL de tampon de lyse (0,5M Arginine ; 50mM Hepes pH7,4 ; 1 pastille d'inhibiteur de protéase (Roche). Les cellules ont ensuite été centrifugées à 150 000g pendant 30 min à 4°C et le surnageant a été dilué dans dix fois son volume dans le tampon de dilution (Hepes 50mM pH7,4 ; NaCl 200mM ; 0,02% Triton) puis centrifugé une nouvelle fois à 150 000g pendant 30 min à 4°C.

Le surnageant a ensuite été déposé sur 4mL d'une colonne de Q sepharose préalablement équilibré (Hepes 50mM pH7,4 ; NaCl 150mM ; 0,02% Triton). Le surnageant passé à travers la colonne ainsi que 5 fois le volume de colonne lavée avec du tampon d'équilibration a été récupérés et la concentration de NaCl réajustée à 400mM. Le surnageant a ensuite été déposé sur une colonne de Cobalt préalablement équilibré (Hepes 50mM ; NaCl 400mM ; 0,02% Triton ; 20mM Imidazol). La colonne a ensuite été successivement lavée avec le même tampon d'équilibration mais avec 30 et 50mM Imidazol. L'elution a été réalisée avec 200mM Imidazol. L'éluat a ensuite été dialysé (Slide-A-Lyzer Dialysis Cassette ThermoScientific) dans du BRB80 KCl (80mM Pipes ; 1mM EGTA ; 1mM MgCl₂ ; 50mM KCl pH6,9), aliquoté, plongé dans l'azote liquide et conservé à -80°C.

Pellet assay :

L'actine G purifiée (collaboration avec Laurent Blanchoin, BIG-CEA-Grenoble) est mise à polymériser à 2μM en présence de 2μM de phalloïdine de façon à stabiliser les filaments d'actine une fois polymérisés à 30°C pendant 1h dans le tampon de polymérisation (2mM Tris PH 8,0 ; 10mM imidazole ; 50mM KCl ; 1mM EGTA ; 1mM MgCl₂ ; 200μM Adénosine Tri-Phosphate ; 500μM DTT ; 100μM CaCl₂).

L'actine polymérisée est ensuite mise en interaction ou non avec les différentes constructions de la protéine MAP6 à 2μM pendant 1h à 30°C dans du tampon de polymérisation.

Les différentes conditions sont ensuite centrifugées soit à 15 000g pendant 25 min pour ne récupérer que les filaments d'actine en faisceaux, soit à 100 000g pendant 10 min pour récupérer l'ensemble de l'actine F (en faisceaux et en filament simple).

Les culots et les surnageants sont par la suite séparés, les culots sont resuspendus dans le même volume initial de tampon de polymérisation puis les culots et les surnageants déposés sur un gel

d'acrylamide 10% et analysés par révélation au bleu de Coomassie.

Préparation des lames et lamelles de TIRF

Les chambres de perfusion ont été préparées avec des lames et lamelles en verre recouvertes PEG-silane activé (Creative PEGwork). Les lames et lamelles ont dans un premier été sonicées dans un bain d'acétone pendant 30 min puis successivement lavées dans de l'acétone puis de l'éthanol à 99% pendant 30 min en lavant les lames et lamelles à l'eau distillée entre chaque étape. Les lames et lamelles sont ensuite traitées dans une solution d'hellmanex 2% (Hellma) pendant 2 à 3 heures puis lavées à l'eau distillée et sonicées dans une solution de KOH 1M avant d'être séchées et mises à incubées sur la nuit dans une solution de PEC-silane (30kDa, creative PEG-work) à 1mg/mL dans de l'éthanol et 0,02% Hcl dans le cas des lames, et dans une solution de PEG-silane biotin (3,5 kDa,LaysanBio) à 1 mg/mL dans le cas des lamelles à température ambiante. Les lames et lamelles sont ensuite lavées avec de l'éthanol 99%, rincées à l'eau distillée puis séchées. Les chambres de perfusions sont ensuite assemblées entre lame et lamelles en utilisant du scotch double face.

Polymérisation de l'actine en vidéomicroscopie TIRF

La chambre de perfusion est initialement lavée en perfusant une solution de tampon de polymérisation avec de la BSA 1%. La polymérisation de l'actine est ensuite initié avec un mix de 300nM d'actine G (contenant 66% d'actine G non marqué et 33% d'actine G atto-565) avec ou en absence des différentes constructions de MAP6 dans du tampon de polymérisation TIRF (2mM Tris PH 8,0 ; 10mM imidazole ; 50mM KCl ; 1mM EGTA ; 1mM MgCl₂; 200μM Adénosine Tri-Phosphate ; 500μM DTT ; 100μM CaCl₂; BSA1% ; 70 μg/mL catalase; 600 μg/mL glucose oxidase ; 1 mg/mL glucose ; 300 nM profilin ; 0,1% methylcellulose (4 000 centipoise)). La polymérisation de l'actine est ensuite visualisée sur un microscope inversé (Eclipse Ti, Nikon) équipé du système TIRF ilas (Roper Scientific) couplé à une camera (EMCCD Evolve 512, Photometrics), une plaque de contrôle de la température (LINKAM MC60), et contrôlé par le logiciel MetaMorph (version 7,7,5, Molecular Devices).

Les échantillons sont excités avec un laser à 561nm et observé via un objectif à immersion d'huile Apochromat x60 NA 1,49. L'acquisition a été réalisée à 1 image toute les 5 secondes avec un temps d'exposition de 80 ms pendant 1 heure.

Analyse de la proportion de faisceaux d'actine

L'analyse des expériences de pellet assay ainsi que la proportion de faisceaux d'actine formée en TIRF a été réalisée en utilisant le logiciel imageJ

Discussion générale

Les microtubules sont des éléments importants des cellules eucaryotes. Ils forment un réseau qui peut présenter de multiple organisation spatiale dépendant notamment de leurs dynamité et de leurs interactions avec d'autres facteurs protéiques. Dans les neurones, les microtubules sont particulièrement stables, présentant une résistance à diverses drogues depolymérisantes comme le nocodazole où encore une résistance à la dépolymérisation induite par le froid. Des études au sein du laboratoire ont permis de mettre en évidence le rôle important de la famille de protéine MAP6 dans cette stabilité des microtubules en étant responsable de la stabilisation des microtubules au froid, mais également à température physiologique. L'absence de la protéine MAP6 entraîne des défauts biologiques et comportementaux réminiscents de certains symptômes de la schizophrénie. Certains de ces défauts et notamment les troubles cognitifs sont corrigés par l'injection d'épothilone D ou le Davunetide, deux drogues régulant la dynamique et la stabilité des microtubules (Andrieux et al., 2006; Fournet et al., 2012; Merenlender-Wagner et al., 2010). L'effet positif de ces drogues microtubulaires sur les altérations biologiques des souris KO MAP6 laissaient penser que la protéine MAP6 pouvait être cruciale pour réguler la dynamique ou la stabilité microtubulaire.

La protéine MAP6 est une protéine associée aux microtubules qui présente différents domaines d'interaction avec les microtubules identifiées dans le laboratoire. La protéine MAP6 possède ainsi des modules Mc, répétés au sein de la protéine, responsables de la stabilisation des microtubules au froid ainsi que 3 modules Mn responsable de la stabilisation à 37°C des microtubules en présence de nocodazole (Bosc et al., 2001). Cependant aucune étude sur l'interaction de MAP6 avec les microtubules ou sur les effets de la protéine sur leur dynamique n'avait été réalisée. Le principal objectif de ma thèse a ainsi été de caractériser l'interaction et les effets de la protéine MAP6 sur les microtubules et de tenter de déterminer quels modules ou régions de la protéine étaient concernés.

A/ Interaction de la protéine MAP6 et effet sur la dynamique des microtubules

Grace à la mise au point de la microscopie TIRF permettant de suivre en temps réel la polymérisation des microtubules, nous avons pu étudier dans un premier temps les effets de la protéine MAP6 sur les microtubules à température physiologique, puis dans un second temps à l'aide de différentes constructions nous avons tenté de déterminer quelles régions de la protéine étaient impliquées dans les effets observés.

Ainsi, bien que longtemps caractérisé pour sa capacité à protéger les microtubules d'une exposition au froid, la protéine MAP6 s'installe aujourd'hui comme une MAP classique à part entière. En effet nos résultats nous ont permis de montrer que la protéine MAP6 était capable d'interagir de façon directe avec les microtubules à 37°C.

Elle est capable d'induire la nucléation spontanée des microtubules en dessous de la concentration critique de nucléation de la tubuline et cette nucléation implique en partie les modules Mn3. De façon intéressante il a également été montré que la protéine MAP6 pouvait dimériser via son module Mn3. Ainsi la protéine pourrait induire la nucléation des microtubules en interagissant avec la tubuline libre et par dimérisation de la protéine MAP6 faciliter le rapprochement et la stabilisation d'ébauche de microtubules facilitant par conséquent la nucléation (Gory et al., 2014)

Nous avons montré que MAP6 permet la stabilisation et la régulation de la dynamique de l'extrémité + des microtubules. La protéine MAP6 va permettre d'augmenter la vitesse de polymérisation des microtubules mais également de diminuer la fréquence de catastrophe et permettre l'apparition d'événements de sauvetage. Ainsi la protéine MAP6 présente les mêmes caractéristiques que certaines MAPs structurales classiques telles que Tau, MAP1, MAP2 ou encore la protéine DCX.

Les différentes constructions de MAP6 nous ont permis de mettre en évidence l'importance des modules Mn dans les effets observés. En effet, au niveau des extrémités + des microtubules, leur dynamique est principalement régulée par les modules Mn1 et Mn2 qui permettent de mimer à eux seuls les effets de la protéine MAP6 sur le bout (+) des microtubules. Cependant et de façon intéressante nous avons observé que le modules Mn3 se comportait de façon tout à fait contraire aux deux premiers modules Mn1 et Mn2 en réduisant la vitesse de polymérisation des microtubules. De plus, aux cours de nos expériences, nous avons pu voir que la protéine MAP6, contrairement aux autres MAPs structurale classique avait une caractéristique unique au niveau de l'extrémité (-) des microtubules. En effet, les MAPs structurales permettent de stabiliser légèrement les bouts (-) des microtubules permettant une polymérisation continue et une réduction de la fréquence de catastrophe des bouts (-). La protéine MAP6 elle interagit avec les bouts (-) des microtubules et diminue puis fige rapidement la polymérisation de cette extrémité. La protéine MAP6 se comporte ainsi plutôt comme une protéine du bout (-) des microtubules, protéines appelées (-TIPs) telles les protéines de la famille CAMSAP. Ces protéines comme MAP6 diminuent la proportion de bouts (-) qualifiées de dynamique (c'est à dire qui montre des phases de polymérisation ou de dépolymérisation) et figent cette extrémité. L'étude de cet effet à l'aide des différentes constructions de MAP6 nous a permis ainsi de mettre en évidence un rôle crucial de la présence du module Mn3. En effet, en présence uniquement du module Mn1 et Mn2, la protéine MP6 se comporterait au contraire comme les MAPs structurales classiques puisque nous avons pu observer une polymérisation continue et stable des extrémités (-). En présence du module Mn3, les bouts (-) sont figés indiquant le rôle crucial de ce module dans la régulation de la dynamique des bouts (-) des

microtubules. Ainsi la protéine MAP6 présente une dualité unique au sein des MAPs en se comportant à la fois comme une MAP structurale mais également en se comportant comme une -TIPs.

Il serait à présent également intéressant d'étudier les modules Mn séparément afin de déterminer si un seul des modules Mn1 ou 2 peut mimer les effets de la protéine MAP6 sur la dynamique du bout (+) des microtubules. De la même façon il serait intéressant de regarder l'effet uniquement du module Mn3 sur l'extrémité (-) du microtubule afin de voir si sa présence est suffisante pour mimer les protéines CAMSAPs ou si il faut un effet coopératif avec les modules Mn1 et 2. Il serait également intéressant d'observer le comportement du bout (-) des MTs dans les cellules déficientes en MAP6.

La protéine MAP6 joue donc un rôle important dans la régulation des microtubules et elle pourrait jouer ainsi un rôle clé dans le développement et la mise place du réseau microtubulaire qui pourrait ainsi expliquer chez les souris KO MAP6 certains des phénotypes observés, ceci en induisant des défauts de neurotransmission qui pourraient être dû en partie à une dérégulation du réseau microtubulaire. De plus, l'effet dual de la protéine MAP6 sur la dynamique des microtubules pourrait jouer un rôle important dans la nucléation non centrosomale ou encore non golgienne. En effet, une hypothèse des protéines CAMSAPs serait une stabilisation de l'extrémité négative des microtubules qui agirait alors comme amorce de polymérisation des microtubules pouvant subir de façon successive des cycles de polymérisation et dépolymérisation. En accord avec cette hypothèse, des études récentes de nucléation au sein du laboratoire avec la protéine MAP6-N sans le module Mn3 ont montré que la nucléation des microtubules était diminuée en absence du module Mn3 dans la protéine MAP6-N. Ainsi la protéine MAP6 pourrait jouer un rôle important de nucléateur de microtubules dans la cellule. Elle pourrait agir dans des endroits difficilement accessible par la nucléation radiale du centrosome en permettant de stabiliser les bouts (-) des microtubules en formation et en stabilisant et régulant également à la fois l'extrémité (+) du microtubule dans un environnement globalement pauvre en tubuline libre afin de maintenir son intégrité comme cela a par exemple été montré pour la protéine CLASP (+TIPs) dans la nucléation golgienne. Ces propriétés pourraient être particulièrement importantes dans les neurones, cellules où les mécanismes de nucléation microtubulaire reste mal connus.

B/Effet sur la structure des microtubules

Les microtubules sont les éléments du cytosquelette les plus rigides des cellules eucaryotes; ils adoptent nativement une structure droite et rectiligne au sein de la cellule. De part leur caractéristiques structurales ils vont jouer un rôle important dans la structure de la cellule mais sont aussi impliqués dans de nombreux processus cellulaires comme la motilité ou encore le transport de vésicules. Dans la cellule différents facteurs vont être capable d'altérer la rigidité des microtubules pour leur permettre de répondre à certains besoins particuliers ou d'atteindre certains espaces subcellulaires.

De nombreuses études ont permis de montrer que certaines protéines ou MAPs étaient capable de modifier la rigidité des microtubules les rendant plus ou moins flexibles. Cependant aucune ne décrit une modification aussi importante de la structure même du microtubule similaire à celle observée en présence de la protéine MAP6. Nous avons en effet rapidement observé que la protéine MAP6 changeait drastiquement la structure des microtubules en leur faisant adopter une structure hélicoïdale qui se met en place au cours de la polymérisation du microtubule. Cet effet semble prendre place uniquement dans certaines gammes de concentration de MAP6. Ce résultat reste cependant à nuancer car les effets observés se produisent pour une concentration supérieure à 100nM et en dessous de 250nM de MAP6-N en vidéo-microscopie TIRF. Au delà de 250 nM les microtubules commencent à nucléer spontanément rendant difficile les observations. Cependant ces derniers semblent au début polymériser en forme d'hélice mais très vite ré-adoptent une forme droite ce qui pourrait s'expliquer non pas par le besoin d'un rapport de concentration de MAP6-N précis mais par une déplétion rapide de la concentration de MAP6-N dans le milieu suite à la nucléation spontanée.

De façon à mieux comprendre comment la protéine MAP6 induisait cette structure nous avons essayé de comprendre si ceci pouvait être du à une malformation ou des défauts de fermeture du microtubule au cours de sa polymérisation. Cependant, le fait que la totalité des microtubules adoptent une hélice antihoraire en présence de MAP6-N laisse penser à un effet de la protéine qui ne soit pas aléatoire et qui semble se répéter tout du long du microtubule de façon à induire cette structure particulière. De plus, la concentration de tubuline n'influe pas sur le pas de l'hélice. En effet, l'augmentation de la concentration de tubuline permet une augmentation de la vitesse de polymérisation et augmente ainsi l'incorporation de défauts au sein de la structure du microtubule. Dans le cas où l'effet serait dû à une incorporation de défauts, le pas de l'hélice ne serait dans un premier temps pas fixe, puisque l'incorporation serait aléatoire, et enfin le pas d'hélice aurait tendance à augmenter avec la vitesse. Or dans cette expérience, le pas de l'hélice n'est pas modifié suggérant que l'effet n'est pas du à une malformation et que celui-ci serait plutôt du à un effet sur la

composition du microtubule ou de son assemblage expliquant la répétition de l'hélice. Le fait que la protéine EB1 soit également toujours capable de lier l'extrémité des microtubules est également en faveur de l'hypothèse selon laquelle la modification observée n'est pas due à une malformation des microtubules ou une anomalie de structure ou de fermeture au niveau du feuillet d'expansion du microtubule.

Des expériences en microscopie STORM ont également été réalisées à Bordeaux de façon à déterminer de façon précise la structure du microtubule en présence de MAP6 et montrer qu'il s'agit bien d'une hélice. Cependant nous avons rencontré des difficultés de mise au point, rendant difficile l'acquisition, la plupart des expériences réalisée en STORM étant faite sur des cellules et non en système reconstitué. Nous sommes donc actuellement en train de déterminer quelles conditions pourraient permettre en STORM de reconstruire en 3D le microtubule hélicoïdal.

Enfin, pratiquement la totalité des constructions de MAP6 qui ont été produites au sein du laboratoire ne sont pas capables de permettre la torsion des microtubules suggérant un effet coopératif de différentes régions de la protéine. De nouvelles constructions sont en train d'être produites pour tenter de déterminer quelles parties de la protéine sont nécessaire à cet effet structural.

Plusieurs hypothèses ont vu le jour au sein du laboratoire pour tenter de comprendre comment la protéine MAP6 pouvait induire cette hélice.

Partant des observations précédentes selon lesquelles la structure serait induite en jouant sur la composition du microtubule, une première hypothèse pour expliquer cet effet serait que la protéine MAP6-N pourrait induire un glissement des protofilaments les uns par rapport aux autres au sein du microtubule, induisant ainsi un décalage des dimères de tubuline entre les protofilaments se traduisant par un léger décalage de la structure du microtubule de façon répétée tout du long du microtubule se traduisant par la formation d'une hélice.

Une autre hypothèse serait que la protéine MAP6-N induise une contrainte au niveau de la paroi du microtubule. Cependant pour que cette hypothèse soit valable, l'effet de MAP6 doit s'effectuer au niveau d'une région du microtubule qui ne soit pas circulaire de façon à ne pas annihiler les effets de contrainte de MAP6 sur le microtubule. Ainsi l'effet de la protéine se ferait au niveau du feuillet du microtubule en polymérisation, seule structure asymétrique au sein du microtubule; ceci prend également en compte le fait que l'effet observé se produise au cours de la polymérisation. La protéine MAP6 figerait la structure du microtubule, ainsi au niveau du feuillet, la protéine MAP6 stabiliserait l'extrémité du microtubule et les protofilaments dans leur conformation native, courbés vers l'extérieur, à l'opposé du lieu de fermeture du sillon. Le feuillet figé dans sa conformation native ne pourrait pas se redresser lors de la fermeture, induisant la totalité du microtubule à suivre

lors de sa fermeture la courbure naturel du feuillet. Ainsi au fur et à mesure de la polymérisation la protéine MAP6 figerait le feuillet durant son expansion. Le feuillet tournerait ainsi au fur et à mesure autour de l'axe longitudinal du microtubule de la même façon que le sillon et forcerait ainsi la polymérisation du microtubule en hélice en sens antihoraire.

Dans les cellules, les microtubules hélicoïdaux pourraient avoir un rôle mécanique dans la résistance à des épreuves mécaniques comme par exemple un écrasement ou une pression exercés sur les neurones, évitant par exemple la collapse des axones.

Les microtubules hélicoïdaux pourraient constituer une sous-population de microtubules qui auraient une affinité particulière pour certains moteurs moléculaires ou serait incapable de former des faisceaux au sein du shaft neuritique, la formation de faisceaux requérant cette fois-ci beaucoup plus de paramètres qu'une simple rencontre.

Un autre effet de l'existence d'une telle population de microtubules hélicoïdaux pourrait être le maintien de l'architecture de l'axone. En effet, au cours de nos expériences, nous nous sommes rendu compte que les microtubules hélicoïdaux étaient extrêmement rigides, et supportaient des forces importantes sans pour autant plier dans le sens du flux. La hauteur de l'hélice est estimée entre 500 nm et 1 µm, on peut envisager que les microtubules hélicoïdaux permettre de maintenir la forme de l'axone en soutenant la membrane plasmique tout du long de l'axone. Il serait donc intéressant de faire des expériences de résistance de cette population de microtubule afin de voir si elle serait suffisamment rigide pour donner une forme ronde à la membrane plasmique des axones, mais également de faire des manips ultrastructurales afin de voir si l'on peut mettre en évidence l'existence de microtubules présent sous la membrane plasmique, comme cela a par exemple été montré pour l'actine, qui décrit des cercles tout du long de l'axone, reliés à des molécules de spectrine, sous la membrane plasmique (Xu et al., 2013). Cependant, l'actine ne présente pas une résistance assez importante pour expliquer le maintien de l'architecture ronde de l'axone. Ainsi l'existence de microtubules hélicoïdaux, associés à la protéine MAP6, pourraient être une alternative possible.

C/MAP6 et ses effets sur l'actine

Longtemps considéré comme une protéine associée aux microtubules lors d'une exposition au froid, nous avons pu montrer que la protéine MAP6 est également capable d'interagir avec les filaments d'actine. Nous avons montré que les modules Mc ont une dualité d'action en liant les microtubules à 4°C et l'actine à température physiologique.

Nous avons montré que la protéine MAP6 interagissait de façon directe avec l'actine et qu'un seul module Mc était capable d'établir une telle interaction. De plus, MAP6 est également capable de former des faisceaux d'actine, propriété également portée par un seul module Mc.

La protéine MAP6 pourrait donc avoir un effet sur la structure des filaments d'actine et permettre leur stabilisation au sein des épines dendritiques afin de maintenir leur architecture ce qui pourrait expliquer la perte de densité d'épines observée chez les neurones KO MAP6. Des expériences au sein du laboratoire sont actuellement en cours afin de déterminer si la protéine MAP6 pourrait également permettre une stabilisation des filaments d'actine en les diluant afin d'induire leur désassemblage. Les premières données semblent montrer que la protéine MAP6, et même un seul module Mc diminuerait la vitesse de désassemblage, stabilisant ainsi les filaments d'actine.

D'autres expériences pourraient également être réalisées en microscopie TIRF en présence de protéine coupant les filaments d'actines comme par exemple la cofiline, permettant d'augmenter l'effet de désassemblage et de voir si la protéine MAP6 pourrait également avoir un effet en protégeant les filaments d'actine.

De plus, nous nous sommes aussi demandés par la suite si la protéine MAP6 pouvait également avoir un effet sur la structure des filaments d'actine autres que la formation de faisceaux, comme par exemple la formation de réseaux branchés d'actine en présence de la protéine Arp2/3. Un tel effet pourrait être important pour le maintien de la forme de la tête de l'épine dendritique et de la surface de contact de la surface post-synaptique et ainsi influencer l'efficacité de la transmission synaptique. Des expériences au sein du laboratoire ont ainsi pu montrer que la présence de la protéine MAP6 n'empêche pas la protéine Arp2/3 de former un réseau d'actine branché. De la même façon, la formation de ce réseau branché n'empêche pas la protéine MAP6 de former des faisceaux d'actine et la protéine MAP6 est également capable d'associer des filaments branchés entre eux au sein du même faisceau de filaments d'actine. Nous sommes également en train de vérifier si la protéine MAP6 pourrait aussi avoir un effet sur la formation du réseau branché en analysant par exemple la distance le long du filament d'actine entre les différents d'embranchement. La protéine MAP6 pourrait ainsi avoir un effet sur la formation du réseau d'actine, le rendant plus lâche ou au contraire plus compact et plus dense ce qui pourrait affecter la structure des épines ou encore leur capacité de remodelage.

Enfin, dans les neurones, de nombreuses molécules ont été identifiées comme étant des régulateurs clés dans le « crosstalk » entre les filaments d'actines et les microtubules, incluant entre autres des protéines capable de lier simultanément les deux filaments (Lee et al., 2002 ; Geraldo et al., 2008). Dernièrement, la MAP structurale Tau a ainsi été montré comme faisant partie des protéines capables de lier à la fois l'actine et les microtubules *in vitro* (Elie et al., 2015). Il serait donc également intéressant de vérifier en microscopie TIRF ou encore en pellet assay si la protéine MAP6 pourrait à la fois lier les filaments d'actines et les microtubules. Si tel est le cas, la protéine MAP6 pourrait ainsi jouer un rôle important dans la réorganisation globale du cytosquelette au cours du développement neuronal en permettant l'alignement et la polymérisation coordonnées des MTs et de l'actine lors par exemple de la croissance du cône axonal (Rochlin et al., 1999 ; Schaefer et al., 2002 ; Rodriguez et al., 2003). De plus, l'interaction et la coordination entre les différents éléments du cytosquelette au sein de la synapse joue un rôle essentiel dans la transmission du message synaptique et dans son relai le long des microtubules et de l'actine vers les dendrites et/ou les axones. MAP6 pourrait être importante pour l'ensemble de ces mécanismes ce qui expliquerait les défauts de plasticité synaptique ainsi que les défauts de neurotransmission dopaminergiques, glutaminergiques et sérotoninergiques observés chez les souris KO MAP6.

D/ Conclusion générale

Notre travail nous a permis de mettre en évidence que la protéine MAP6 est une MAP classique qui présente de nombreuses facettes. En effet outre sa capacité à réguler et stabiliser la dynamique des microtubules à 37°C, MAP6 est également capable de protéger les microtubules d'une exposition au froid mais aussi d'interagir avec un autre élément du cytosquelette, l'actine pour réguler son organisation. De plus, MAP6 montre également des capacités unique au sein des MAPs classiques comme celle de présenter une dualité d'action entre les bouts (+) et (-) puisqu'elle est capable d'avoir le même effet sur l'extrémité (-) des microtubules que les -TIPs ou encore la capacité de modifier la structure même du microtubule. La structure intrinsèque du microtubule est droite et rigide mais ils peuvent se déformer, devenir flexible en s'associant avec des MAPs structurale mais nos travaux avec la protéine MAP6 donne une nouvelle vision de la structure possible des microtubules qui n'est pas celle globalement proposée, mais au contraire une structure en trois dimensions permettant d'adopter une nouvelle conformation hélicoïdale, qui pourrait ainsi permettre aux microtubules d'assumer d'autres fonctions qui restent à être identifiées.

Bibliographie

Aguezzoul, M., Andrieux, A., and Denarier, E. (2003). Overlap of promoter and coding sequences in the mouse STOP gene (Mtap6). *Genomics* *81*, 623–627.

Akhmanova, A., Hoogenraad, C.C., Drabek, K., Stepanova, T., Dortland, B., Verkerk, T., Vermeulen, W., Burgering, B.M., De Zeeuw, C.I., Grosveld, F., et al. (2001). Clasps are CLIP-115 and -170 associating proteins involved in the regional regulation of microtubule dynamics in motile fibroblasts. *Cell* *104*, 923–935.

Al-Bassam, J., Kim, H., Brouhard, G., van Oijen, A., Harrison, S.C., and Chang, F. (2010). CLASP promotes microtubule rescue by recruiting tubulin dimers to the microtubule. *Dev. Cell* *19*, 245–258.

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.

Andersen, S.S. (2000). Spindle assembly and the art of regulating microtubule dynamics by MAPs and Stathmin/Op18. *Trends Cell Biol.* *10*, 261–267.

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.

Andrieux, A., Salin, P.A., Vernet, M., Kujala, P., Baratier, J., Gory-Fauré, S., Bosc, C., Pointu, H., Proietto, D., Schweitzer, A., et al. (2002). The suppression of brain cold-stable microtubules in mice induces synaptic defects associated with neuroleptic-sensitive behavioral disorders. *Genes Dev.* *16*, 2350–2364.

Andrieux, A., Salin, P., Schweitzer, A., Bégou, M., Pachoud, B., Brun, P., Gory-Fauré, S., Kujala, P., Suaud-Chagny, M.-F., Höfle, G., et al. (2006). Microtubule stabilizer ameliorates synaptic function and behavior in a mouse model for schizophrenia. *Biol. Psychiatry* *60*, 1224–1230.

Arama, J., Boulay, A.-C., Bosc, C., Delphin, C., Loew, D., Rostaing, P., Amigou, E., Ezan, P., Wingertsmann, L., Guillaud, L., et al. (2012). Bmcc1s, a novel brain-isoform of Bmcc1, affects cell morphology by regulating MAP6/STOP functions. *PLoS ONE* *7*, e35488.

Araya, R., Jiang, J., Eisenthal, K.B., and Yuste, R. (2006). The spine neck filters membrane potentials. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* *103*, 17961–17966.

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.* *14*, 2086–2095.

Baas, P.W., Pienkowski, T.P., and Kosik, K.S. (1991). Processes induced by tau expression in Sf9 cells have an axon-like microtubule organization. *J. Cell Biol.* *115*, 1333–1344.

Baas, P.W., Pienkowski, T.P., Cimbalnik, K.A., Toyama, K., Bakalis, S., Ahmad, F.J., and Kosik, K.S. (1994). Tau confers drug stability but not cold stability to microtubules in living cells. *J. Cell. Sci.* *107 (Pt 1)*, 135–143.

Baines, A.J., Bignone, P.A., King, M.D.A., Maggs, A.M., Bennett, P.M., Pinder, J.C., and Phillips, G.W. (2009). The CKK Domain (DUF1781) Binds Microtubules and Defines the CAMSAP/ssp4 Family of Animal Proteins. *Mol Biol Evol* *26*, 2005–2014.

Baratier, J., Peris, L., Brocard, J., Gory-Fauré, S., Dufour, F., Bosc, C., Fourest-Lievin, A., Blanchoin, L., Salin, P., Job, D., et al. (2006). Phosphorylation of microtubule-associated protein STOP by calmodulin kinase II. *J. Biol. Chem.* *281*, 19561–19569.

Barlow, S., Gonzalez-Garay, M.L., West, R.R., Olmsted, J.B., and Cabral, F. (1994). Stable expression of heterologous microtubule-associated proteins (MAPs) in Chinese hamster ovary cells: evidence for differing roles of MAPs in microtubule organization. *J. Cell Biol.* *126*, 1017–1029.

Bégou, M., Brun, P., Bertrand, J.-B., Job, D., Schweitzer, A., D'Amato, T., Saoud, M., Andrieux, A., and Suaud-Chagny, M.-F. (2007). Post-pubertal emergence of alterations in locomotor activity in stop null mice. *Synapse* *61*, 689–697.

Bégou, M., Volle, J., Bertrand, J.-B., Brun, P., Job, D., Schweitzer, A., Saoud, M., D'Amato, T., Andrieux, A., and Suaud-Chagny, M.-F. (2008). The stop null mice model for schizophrenia displays [corrected] cognitive and social deficits partly alleviated by neuroleptics. *Neuroscience* *157*, 29–39.

Bellouze, S., Schäfer, M.K., Buttigieg, D., Baillat, G., Rabouille, C., and Haase, G. (2014). Golgi fragmentation in pmn mice is due to a defective ARF1/TBCE cross-talk that coordinates COPI vesicle formation and tubulin polymerization. *Hum. Mol. Genet.* *23*, 5961–5975.

Belmont, L.D., and Mitchison, T.J. (1996). Identification of a protein that interacts with tubulin dimers and increases the catastrophe rate of microtubules. *Cell* *84*, 623–631.

Benardais, K., Kasem, B., Couegnas, A., Samama, B., Fernandez, S., Schaeffer, C., Antal, M.-C., Job, D., Schweitzer, A., Andrieux, A., et al. (2010). Loss of STOP protein impairs peripheral olfactory neurogenesis. *PLoS ONE* *5*, e12753.

Bielas, S.L., Serneo, F.F., Chechlacz, 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., Laan, L., Schek, H., Munteanu, E.L., Sandblad, L., Dogterom, M., Brunner, D., and Surrey, T. (2007). Reconstitution of a microtubule plus-end tracking system in vitro. *Nature* *450*, 1100–1105.

Biernat, J., Gustke, N., Drewes, G., Mandelkow, E.M., and Mandelkow, E. (1993). Phosphorylation of Ser262 strongly reduces binding of tau to microtubules: distinction between PHF-like immunoreactivity and microtubule binding. *Neuron* *11*, 153–163.

Binder, L.I., Frankfurter, A., and Rebhun, L.I. (1985). The distribution of tau in the mammalian central nervous system. *J. Cell Biol.* *101*, 1371–1378.

Blanchoin, L., Amann, K.J., Higgs, H.N., Marchand, J.B., Kaiser, D.A., and Pollard, T.D. (2000). Direct observation of dendritic actin filament networks nucleated by Arp2/3 complex and WASP/Scar proteins. *Nature* *404*, 1007–1011.

- Blanpied, T.A., and Ehlers, M.D. (2004). Microanatomy of dendritic spines: emerging principles of synaptic pathology in psychiatric and neurological disease. *Biol. Psychiatry* *55*, 1121–1127.
- 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.
- Bosc, C., Frank, R., Denarier, E., Ronjat, M., Schweitzer, A., Wehland, J., and Job, D. (2001). Identification of novel bifunctional calmodulin-binding and microtubule-stabilizing motifs in STOP proteins. *J. Biol. Chem.* *276*, 30904–30913.
- Bouquet, C., Soares, S., von Boxberg, Y., Ravaille-Veron, M., Propst, F., and Nothias, F. (2004). Microtubule-associated protein 1B controls directionality of growth cone migration and axonal branching in regeneration of adult dorsal root ganglia neurons. *J. Neurosci.* *24*, 7204–7213.
- Brangwynne, C.P., MacKintosh, F.C., Kumar, S., Geisse, N.A., Talbot, J., Mahadevan, L., Parker, K.K., Ingber, D.E., and Weitz, D.A. (2006). Microtubules can bear enhanced compressive loads in living cells because of lateral reinforcement. *J. Cell Biol.* *173*, 733–741.
- 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.
- Brugg, B., Reddy, D., and Matus, A. (1993). Attenuation of microtubule-associated protein 1B expression by antisense oligodeoxynucleotides inhibits initiation of neurite outgrowth. *Neuroscience* *52*, 489–496.
- Brun, P., Bégou, M., Andrieux, A., Mouly-Badina, L., Clerget, M., Schweitzer, A., Scarna, H., Renaud, B., Job, D., and Suaud-Chagny, M.-F. (2005). Dopaminergic transmission in STOP null mice. *J. Neurochem.* *94*, 63–73.
- Busch, K.E., and Brunner, D. (2004). The microtubule plus end-tracking proteins mal3p and tip1p cooperate for cell-end targeting of interphase microtubules. *Curr. Biol.* *14*, 548–559.
- 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. (1984a). MAP2 is localized to the dendrites of hippocampal neurons which develop in culture. *Brain Res.* *315*, 314–318.
- Caceres, A., Binder, L.I., Payne, M.R., Bender, P., Rebhun, L., and Steward, O. (1984b). Differential subcellular localization of tubulin and the microtubule-associated protein MAP2 in brain tissue as revealed by immunocytochemistry with monoclonal hybridoma antibodies. *J. Neurosci.* *4*, 394–410.
- Caceres, A., Potrebic, S., and Kosik, K.S. (1991). The effect of tau antisense oligonucleotides on neurite formation of cultured cerebellar macroneurons. *J. Neurosci.* *11*, 1515–1523.

- 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., and Pantaloni, D. (1981). Kinetic analysis of guanosine 5'-triphosphate hydrolysis associated with tubulin polymerization. *Biochemistry* *20*, 1918–1924.
- Carvalho, P., Tirnauer, J.S., and Pellman, D. (2003). Surfing on microtubule ends. *Trends Cell Biol.* *13*, 229–237.
- 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.
- Cassimeris, L., Pryer, N.K., and Salmon, E.D. (1988). Real-time observations of microtubule dynamic instability in living cells. *J. Cell Biol.* *107*, 2223–2231.
- Caudron, N., Valiron, O., Usson, Y., Valiron, P., and Job, D. (2000). A reassessment of the factors affecting microtubule assembly and disassembly in vitro. *J. Mol. Biol.* *297*, 211–220.
- Chabin-Brion, K., Marceiller, J., Perez, F., Settegrana, C., Drechou, A., Durand, G., and Poüs, C. (2001). The Golgi complex is a microtubule-organizing organelle. *Mol. Biol. Cell* *12*, 2047–2060.
- Chan, C., Beltzner, C.C., and Pollard, T.D. (2009). Cofilin dissociates Arp2/3 complex and branches from actin filaments. *Curr. Biol.* *19*, 537–545.
- Chang, L., Jones, Y., Ellisman, M.H., Goldstein, L.S.B., and Karin, M. (2003). JNK1 is required for maintenance of neuronal microtubules and controls phosphorylation of microtubule-associated proteins. *Dev. Cell* *4*, 521–533.
- 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.
- Cho, J.-H., and Johnson, G.V.W. (2003). Glycogen synthase kinase 3beta 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* *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., Jánosi, I., Taveau, J.C., and Flyvbjerg, H. (1999). Microtubule's conformational cap. *Cell Struct. Funct.* *24*, 299–303.

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.

Cleveland, D.W., Hwo, S.Y., and Kirschner, M.W. (1977). Purification of tau, a microtubule-associated protein that induces assembly of microtubules from purified tubulin. *J. Mol. Biol.* *116*, 207–225.

Collins, M.O., Yu, L., Coba, M.P., Husi, H., Campuzano, I., Blackstock, W.P., Choudhary, J.S., and Grant, S.G.N. (2005). Proteomic analysis of in vivo phosphorylated synaptic proteins. *J. Biol. Chem.* *280*, 5972–5982.

Constantin, B., Meerschaert, K., Vandekerckhove, J., and Gettemans, J. (1998). Disruption of the actin cytoskeleton of mammalian cells by the capping complex actin-fragmin is inhibited by actin phosphorylation and regulated by Ca²⁺ ions. *J. Cell. Sci.* *111* (Pt 12), 1695–1706.

Coquelle, F.M., Vitre, B., and Arnal, I. (2009). Structural basis of EB1 effects on microtubule dynamics. *Biochem. Soc. Trans.* *37*, 997–1001.

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.

Cravchik, A., Reddy, D., and Matus, A. (1994). Identification of a novel microtubule-binding domain in microtubule-associated protein 1A (MAP1A). *J. Cell. Sci.* *107* (Pt 3), 661–672.

Dehmelt, L., and Halpain, S. (2004). Actin and microtubules in neurite initiation: are MAPs the missing link? *J. Neurobiol.* *58*, 18–33.

Dehmelt, L., Smart, F.M., Ozer, R.S., and Halpain, S. (2003). The role of microtubule-associated protein 2c in the reorganization of microtubules and lamellipodia during neurite initiation. *J. Neurosci.* *23*, 9479–9490.

Delotterie, D., Ruiz, G., Brocard, J., Schweitzer, A., Roucard, C., Roche, Y., Suaud-Chagny, M.-F., Bressand, K., and Andrieux, A. (2010). Chronic administration of atypical antipsychotics improves behavioral and synaptic defects of STOP null mice. *Psychopharmacology (Berl.)* *208*, 131–141.

Deloulme, J.-C., Gory-Fauré, S., Mauconduit, F., Chauvet, S., Jonckheere, J., Boulan, B., Mire, E., Xue, J., Jany, M., Maucler, C., et al. (2015). Microtubule-associated protein 6 mediates neuronal connectivity through Semaphorin 3E-dependent signalling for axonal growth. *Nat Commun* *6*, 7246.

Delphin, C., Bouvier, D., Seggio, M., Couriol, E., Saoudi, Y., Denarier, E., Bosc, C., Valiron, O., Bisbal, M., Arnal, I., et al. (2012). MAP6-F is a temperature sensor that directly binds to and protects microtubules from cold-induced depolymerization. *J. Biol. Chem.* *287*, 35127–35138.

- Denarier, E., Aguezzoul, M., Jolly, C., Vourc'h, C., Roure, A., Andrieux, A., Bosc, C., and Job, D. (1998). Genomic structure and chromosomal mapping of the mouse STOP gene (Mtap6). *Biochem. Biophys. Res. Commun.* *243*, 791–796.
- De Roo, M., Klauser, P., Garcia, P.M., Poglia, L., and Muller, D. (2008a). Spine dynamics and synapse remodeling during LTP and memory processes. *Prog. Brain Res.* *169*, 199–207.
- De Roo, M., Klauser, P., and Muller, D. (2008b). LTP promotes a selective long-term stabilization and clustering of dendritic spines. *PLoS Biol.* *6*, e219.
- 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.
- 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.
- 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. *Mol. Biol. Cell* *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.
- Duan, A.R., and Goodson, H.V. (2012). Taxol-stabilized microtubules promote the formation of filaments from unmodified full-length Tau in vitro. *Mol. Biol. Cell* *23*, 4796–4806.
- Dye, R.B., Fink, S.P., and Williams, R.C. (1993). Taxol-induced flexibility of microtubules and its reversal by MAP-2 and Tau. *J. Biol. Chem.* *268*, 6847–6850.
- 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.
- Efimov, A., Kharitonov, A., Efimova, N., Loncarek, J., Miller, P.M., Andreyeva, N., Gleeson, P., Galjart, N., Maia, A.R.R., McLeod, I.X., et al. (2007). Asymmetric CLASP-dependent nucleation of noncentrosomal microtubules at the trans-Golgi network. *Dev. Cell* *12*, 917–930.
- Elie, A., Prezel, E., Guérin, C., Denarier, E., Ramirez-Rios, S., Serre, L., Andrieux, A., Fourest-Lievin, A., Blanchoin, L., and Arnal, I. (2015). Tau co-organizes dynamic microtubule and actin networks. *Sci Rep* *5*, 9964.
- Elie-Caille, C., Severin, F., Helenius, J., Howard, J., Muller, D.J., and Hyman, A.A. (2007). Straight GDP-tubulin protofilaments form in the presence of taxol. *Curr. Biol.* *17*, 1765–1770.
- 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.

- Felgner, H., Frank, R., and Schliwa, M. (1996). Flexural rigidity of microtubules measured with the use of optical tweezers. *J. Cell. Sci.* *109* (Pt 2), 509–516.
- Felgner, H., Frank, R., Biernat, J., Mandelkow, E.M., Mandelkow, E., Ludin, B., Matus, A., and Schliwa, M. (1997). Domains of neuronal microtubule-associated proteins and flexural rigidity of microtubules. *J. Cell Biol.* *138*, 1067–1075.
- Ferhat, L., Represa, A., Bernard, A., Ben-Ari, Y., and Khrestchatsky, M. (1996). MAP2d promotes bundling and stabilization of both microtubules and microfilaments. *J. Cell. Sci.* *109* (Pt 5), 1095–1103.
- Fink, J.K., Jones, S.M., Esposito, C., and Wilkowski, J. (1996). Human microtubule-associated protein 1a (MAP1A) gene: genomic organization, cDNA sequence, and developmental- and tissue-specific expression. *Genomics* *35*, 577–585.
- Fischer, D., Mukrasch, M.D., Biernat, J., Bibow, S., Blackledge, M., Griesinger, C., Mandelkow, E., and Zweckstetter, M. (2009). Conformational changes specific for pseudophosphorylation at serine 262 selectively impair binding of tau to microtubules. *Biochemistry* *48*, 10047–10055.
- Fischer, M., Kaech, S., Knutti, D., and Matus, A. (1998). Rapid actin-based plasticity in dendritic spines. *Neuron* *20*, 847–854.
- 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.
- Folker, E.S., Baker, B.M., and Goodson, H.V. (2005). Interactions between CLIP-170, tubulin, and microtubules: implications for the mechanism of Clip-170 plus-end tracking behavior. *Mol. Biol. Cell* *16*, 5373–5384.
- Fournet, V., Jany, M., Fabre, V., Chali, F., Orsal, D., Schweitzer, A., Andrieux, A., Messanvi, F., Giros, B., Hamon, M., et al. (2010). The deletion of the microtubule-associated STOP protein affects the serotonergic mouse brain network. *J. Neurochem.* *115*, 1579–1594.
- Fournet, V., de Lavilléon, G., Schweitzer, A., Giros, B., Andrieux, A., and Martres, M.-P. (2012). Both chronic treatments by epothilone D and fluoxetine increase the short-term memory and differentially alter the mood status of STOP/MAP6 KO mice. *J. Neurochem.* *123*, 982–996.
- Fradley, R.L., O’Meara, G.F., Newman, R.J., Andrieux, A., Job, D., and Reynolds, D.S. (2005). STOP knockout and NMDA NR1 hypomorphic mice exhibit deficits in sensorimotor gating. *Behav. Brain Res.* *163*, 257–264.
- Frankle, W.G., Lerma, J., and Laruelle, M. (2003). The synaptic hypothesis of schizophrenia. *Neuron* *39*, 205–216.
- Fu, X., Brown, K.J., Yap, C.C., Winckler, B., Jaiswal, J.K., and Liu, J.S. (2013). Doublecortin (Dcx) family proteins regulate filamentous actin structure in developing neurons. *J. Neurosci.* *33*, 709–721.
- Fuhrmann, M., Mitteregger, G., Kretzschmar, H., and Herms, J. (2007). Dendritic pathology in prion disease starts at the synaptic spine. *J. Neurosci.* *27*, 6224–6233.

- 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.
- 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.* *14*, R797–R805.
- Galiano, M.R., Bosc, C., Schweitzer, A., Andrieux, A., Job, D., and Hallak, M.E. (2004). Astrocytes and oligodendrocytes express different STOP protein isoforms. *J. Neurosci. Res.* *78*, 329–337.
- Gamblin, T.C., Nachmanoff, K., Halpain, S., and Williams, R.C. (1996). Recombinant microtubule-associated protein 2c reduces the dynamic instability of individual microtubules. *Biochemistry* *35*, 12576–12586.
- Gaskin, F. (2011). Analysis of microtubule assembly kinetics using turbidimetry. *Methods Mol. Biol.* *777*, 99–105.
- Gaskin, F., Cantor, C.R., and Shelanski, M.L. (1974). Turbidimetric studies of the in vitro assembly and disassembly of porcine neurotubules. *J. Mol. Biol.* *89*, 737–755.
- Gdalyahu, A., Ghosh, I., Levy, T., Sapir, T., Sapoznik, S., Fishler, Y., Azoulai, D., and Reiner, O. (2004). DCX, a new mediator of the JNK pathway. *EMBO J.* *23*, 823–832.
- 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.
- Gittes, F., Mickey, B., Nettleton, J., and Howard, J. (1993). Flexural rigidity of microtubules and actin filaments measured from thermal fluctuations in shape. *J. Cell Biol.* *120*, 923–934.
- Gleason, M.R., Higashijima, S., Dallman, J., Liu, K., Mandel, G., and Fethcho, J.R. (2003). Translocation of CaM kinase II to synaptic sites in vivo. *Nat. Neurosci.* *6*, 217–218.
- Gleeson, J.G., Allen, K.M., Fox, J.W., Lamperti, E.D., Berkovic, S., Scheffer, I., Cooper, E.C., Dobyns, W.B., Minnerath, S.R., Ross, M.E., et al. (1998). Doublecortin, a brain-specific gene mutated in human X-linked lissencephaly and double cortex syndrome, encodes a putative signaling protein. *Cell* *92*, 63–72.
- Gleeson, J.G., Lin, P.T., Flanagan, L.A., and Walsh, C.A. (1999). Doublecortin is a microtubule-associated protein and is expressed widely by migrating neurons. *Neuron* *23*, 257–271.
- 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.
- 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.
- Goodson, H.V., Skube, S.B., Stalder, R., Valetti, C., Kreis, T.E., Morrison, E.E., and Schroer, T.A. (2003). CLIP-170 interacts with dynein complex and the APC-binding protein EB1 by different mechanisms. *Cell Motil. Cytoskeleton* *55*, 156–173.
- Goodwin, S.S., and Vale, R.D. (2010). Patronin regulates the microtubule network by protecting microtubule minus ends. *Cell* *143*, 263–274.
- Gory-Fauré, S., Windscheid, V., Bosc, C., Peris, L., Proietto, D., Franck, R., Denarier, E., Job, D., and Andrieux, A. (2006). STOP-like protein 21 is a novel member of the STOP family, revealing a Golgi localization of STOP proteins. *J. Biol. Chem.* *281*, 28387–28396.
- Gory-Fauré, S., Windscheid, V., Brocard, J., Montessuit, S., Tsutsumi, R., Denarier, E., Fukata, Y., Bosc, C., Delaroche, J., Collomb, N., et al. (2014). Non-microtubular localizations of microtubule-associated protein 6 (MAP6). *PLoS ONE* *9*, e114905.
- Goshima, G. (2006). [Roles of kinesins in mitosis]. *Tanpakushitsu Kakusan Koso* *51*, 579–585.
- Goshima, G., Wollman, R., Goodwin, S.S., Zhang, N., Scholey, J.M., Vale, R.D., and Stuurman, N. (2007). Genes required for mitotic spindle assembly in Drosophila S2 cells. *Science* *316*, 417–421.
- Grundke-Iqbali, 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.
- 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.
- Gustke, N., Trinczek, B., Biernat, J., Mandelkow, E.M., and Mandelkow, E. (1994). Domains of tau protein and interactions with microtubules. *Biochemistry* *33*, 9511–9522.
- Hammarback, J.A., Obar, R.A., Hughes, S.M., and Vallee, R.B. (1991). MAP1B is encoded as a polyprotein that is processed to form a complex N-terminal microtubule-binding domain. *Neuron* *7*, 129–139.
- Harada, A., Oguchi, K., Okabe, S., Kuno, J., Terada, S., Ohshima, T., Sato-Yoshitake, R., Takei, Y., Noda, T., and Hirokawa, N. (1994a). Altered microtubule organization in small-calibre axons of mice lacking tau protein. *Nature* *369*, 488–491.
- Harada, A., Oguchi, K., Okabe, S., Kuno, J., Terada, S., Ohshima, T., Sato-Yoshitake, R., Takei, Y., Noda, T., and Hirokawa, N. (1994b). Altered microtubule organization in small-calibre axons of mice lacking tau protein. *Nature* *369*, 488–491.

- Harris, H.E., and Weeds, A.G. (1984). Plasma gelsolin caps and severs actin filaments. *FEBS Lett.* *177*, 184–188.
- Hayden, J.H., Bowser, S.S., and Rieder, C.L. (1990). Kinetochores capture astral microtubules during chromosome attachment to the mitotic spindle: direct visualization in live newt lung cells. *J. Cell Biol.* *111*, 1039–1045.
- 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.
- Hendershott, M.C., and Vale, R.D. (2014). Regulation of microtubule minus-end dynamics by CAMSAPs and Patronin. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* *111*, 5860–5865.
- Higgs, H.N., and Pollard, T.D. (2001). Regulation of actin filament network formation through ARP2/3 complex: activation by a diverse array of proteins. *Annu. Rev. Biochem.* *70*, 649–676.
- Hirokawa, N. (1994). Microtubule organization and dynamics dependent on microtubule-associated proteins. *Curr. Opin. Cell Biol.* *6*, 74–81.
- 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., Pfister, K.K., Yorifuji, H., Wagner, M.C., Brady, S.T., and Bloom, G.S. (1989). Submolecular domains of bovine brain kinesin identified by electron microscopy and monoclonal antibody decoration. *Cell* *56*, 867–878.
- Holmes, K.C., Popp, D., Gebhard, W., and Kabsch, W. (1990). Atomic model of the actin filament. *Nature* *347*, 44–49.
- Holtmaat, A., Wilbrecht, L., Knott, G.W., Welker, E., and Svoboda, K. (2006). Experience-dependent and cell-type-specific spine growth in the neocortex. *Nature* *441*, 979–983.
- Höög, J.L., and Antony, C. (2007). Whole-cell investigation of microtubule cytoskeleton architecture by electron tomography. *Methods Cell Biol.* *79*, 145–167.
- Hoogenraad, C.C., Akhmanova, A., Grosveld, F., De Zeeuw, C.I., and Galjart, N. (2000). Functional analysis of CLIP-115 and its binding to microtubules. *J. Cell. Sci.* *113* (Pt 12), 2285–2297.
- Hoogenraad, C.C., Koekkoek, B., Akhmanova, A., Krugers, H., Dortland, B., Miedema, M., van Alphen, A., Kistler, W.M., Jaegle, M., Koutsourakis, M., et al. (2002). Targeted mutation of Clyn2 in the Williams syndrome critical region links CLIP-115 haploinsufficiency to neurodevelopmental abnormalities in mice. *Nat. Genet.* *32*, 116–127.
- Horesh, D., Sapir, T., Francis, F., Wolf, S.G., Caspi, M., Elbaum, M., Chelly, J., and Reiner, O. (1999). Doublecortin, a stabilizer of microtubules. *Hum. Mol. Genet.* *8*, 1599–1610.
- Horio, T., and Hotani, H. (1986). Visualization of the dynamic instability of individual microtubules by dark-field microscopy. *Nature* *321*, 605–607.
- 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.
- Huber, G., and Matus, A. (1984). Differences in the cellular distributions of two microtubule-associated proteins, MAP1 and MAP2, in rat brain. *J. Neurosci.* *4*, 151–160.
- Hunyadi, V., Chrétien, D., and Jánosi, I.M. (2005). Mechanical stress induced mechanism of microtubule catastrophes. *J. Mol. Biol.* *348*, 927–938.
- 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.
- Inoué, S., and Sato, H. (1967). Cell motility by labile association of molecules. The nature of mitotic spindle fibers and their role in chromosome movement. *J. Gen. Physiol.* *50*, Suppl:259–292.
- Insall, R., Müller-Taubenberger, A., Machesky, L., Köhler, J., Simmeth, E., Atkinson, S.J., Weber, I., and Gerisch, G. (2001). Dynamics of the Dictyostelium Arp2/3 complex in endocytosis, cytokinesis, and chemotaxis. *Cell Motil. Cytoskeleton* *50*, 115–128.
- Jánosi, I.M., Chrétien, D., and Flyvbjerg, H. (1998). Modeling elastic properties of microtubule tips and walls. *Eur. Biophys. J.* *27*, 501–513.
- Janson, M.E., and Dogterom, M. (2004). A bending mode analysis for growing microtubules: evidence for a velocity-dependent rigidity. *Biophys. J.* *87*, 2723–2736.
- Jho, Y.S., Zhulina, E.B., Kim, M.W., and Pincus, P.A. (2010). Monte carlo simulations of tau proteins: effect of phosphorylation. *Biophys. J.* *99*, 2387–2397.
- Jiang, K., Hua, S., Mohan, R., Grigoriev, I., Yau, K.W., Liu, Q., Katrukha, E.A., Altelaar, A.F.M., Heck, A.J.R., Hoogenraad, C.C., et al. (2014). Microtubule minus-end stabilization by polymerization-driven CAMSAP deposition. *Dev. Cell* *28*, 295–309.
- Job, D., Fischer, E.H., and Margolis, R.L. (1981). Rapid disassembly of cold-stable microtubules by calmodulin. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* *78*, 4679–4682.
- Job, D., Rauch, C.T., Fischer, E.H., and Margolis, R.L. (1983). Regulation of microtubule cold stability by calmodulin-dependent and -independent phosphorylation. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* *80*, 3894–3898.
- Job, D., Valiron, O., and Oakley, B. (2003). Microtubule nucleation. *Curr. Opin. Cell Biol.* *15*, 111–117.
- Kanai, Y., Chen, J., and Hirokawa, N. (1992). Microtubule bundling by tau proteins in vivo: analysis of functional domains. *EMBO J.* *11*, 3953–3961.

- 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.
- 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.
- Kasai, H., Hayama, T., Ishikawa, M., Watanabe, S., Yagishita, S., and Noguchi, J. (2010). Learning rules and persistence of dendritic spines. *Eur. J. Neurosci.* *32*, 241–249.
- Kawaguchi, K., and Yamaguchi, A. (2010). Temperature dependence rigidity of non-taxol stabilized single microtubules. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* *402*, 66–69.
- Kawaguchi, K., Ishiwata, S. 'ichi, and Yamashita, T. (2008). Temperature dependence of the flexural rigidity of single microtubules. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* *366*, 637–642.
- Ke, Y.D., Suchowerska, A.K., van der Hoven, J., De Silva, D.M., Wu, C.W., van Eersel, J., Ittner, A., and Ittner, L.M. (2012). Lessons from tau-deficient mice. *Int J Alzheimers Dis* *2012*, 873270.
- Khaitina, S.Y. (2001). Functional specificity of actin isoforms. *Int. Rev. Cytol.* *202*, 35–98.
- 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.
- Kinzler, K.W., and Vogelstein, B. (1996). Life (and death) in a malignant tumour. *Nature* *379*, 19–20.
- Kiselar, J.G., Janmey, P.A., Almo, S.C., and Chance, M.R. (2003). Visualizing the Ca²⁺-dependent activation of gelsolin by using synchrotron footprinting. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* *100*, 3942–3947.
- 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. *Structure* *12*, 999–1013.
- 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.
- Kollman, J.M., Merdes, A., Mourey, L., and Agard, D.A. (2011). Microtubule nucleation by γ-tubulin complexes. *Nat. Rev. Mol. Cell Biol.* *12*, 709–721.
- Kolman, A. (2004). Epothilone D (Kosan/Roche). *Curr Opin Investig Drugs* *5*, 657–667.
- Komarova, Y.A., Akhmanova, A.S., Kojima, S.-I., Galjart, N., and Borisy, G.G. (2002). Cytoplasmic linker proteins promote microtubule rescue in vivo. *J. Cell Biol.* *159*, 589–599.
- Koning, R.I., Zovko, S., Bárcena, M., Oostergetel, G.T., Koerten, H.K., Galjart, N., Koster, A.J., and Mieke Mommaas, A. (2008). Cryo electron tomography of vitrified fibroblasts: microtubule plus ends in situ. *J. Struct. Biol.* *161*, 459–468.
- Kosik, K.S., Orecchio, L.D., Bakalis, S., and Neve, R.L. (1989). Developmentally regulated expression of specific tau sequences. *Neuron* *2*, 1389–1397.

- 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.
- Kowalski, R.J., and Williams, R.C. (1993). Microtubule-associated protein 2 alters the dynamic properties of microtubule assembly and disassembly. *J. Biol. Chem.* *268*, 9847–9855.
- Kuchnir Fygenson D, null, Flyvbjerg, null, Sneppen, null, Libchaber, null, and Leibler, null (1995). Spontaneous nucleation of microtubules. *Phys Rev E Stat Phys Plasmas Fluids Relat Interdiscip Topics* *51*, 5058–5063.
- Kuznetsov, S.A., Rodionov, V.I., Gelfand, V.I., and Rosenblat, V.A. (1981). Microtubule-associated protein MAP1 promotes microtubule assembly in vitro. *FEBS Lett.* *135*, 241–244.
- Langkopf, A., Hammarback, J.A., Müller, R., Vallee, R.B., and Garner, C.C. (1992). Microtubule-associated proteins 1A and LC2. Two proteins encoded in one messenger RNA. *J. Biol. Chem.* *267*, 16561–16566.
- Lansbergen, G., and Akhmanova, A. (2006). Microtubule plus end: a hub of cellular activities. *Traffic* *7*, 499–507.
- 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.
- Lawrence, C.J., Dawe, R.K., Christie, K.R., Cleveland, D.W., Dawson, S.C., Endow, S.A., Goldstein, L.S.B., Goodson, H.V., Hirokawa, N., Howard, J., et al. (2004). A standardized kinesin nomenclature. *J Cell Biol* *167*, 19–22.
- Lee, G., and Rook, S.L. (1992). Expression of tau protein in non-neuronal cells: microtubule binding and stabilization. *J. Cell. Sci.* *102* (Pt 2), 227–237.
- 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.
- Lewis, S.A., Sherline, P., and Cowan, N.J. (1986). A cloned cDNA encoding MAP1 detects a single copy gene in mouse and a brain-abundant RNA whose level decreases during development. *J. Cell Biol.* *102*, 2106–2114.
- Lewis, S.A., Ivanov, I.E., Lee, G.H., and Cowan, N.J. (1989). Organization of microtubules in dendrites and axons is determined by a short hydrophobic zipper in microtubule-associated proteins MAP2 and tau. *Nature* *342*, 498–505.
- Lieberman, J.A., Perkins, D., Belger, A., Chakos, M., Jarskog, F., Boteva, K., and Gilmore, J. (2001). The early stages of schizophrenia: speculations on pathogenesis, pathophysiology, and therapeutic approaches. *Biol. Psychiatry* *50*, 884–897.

- Lieleg, O., Schmoller, K.M., Purdy Drew, K.R., Claessens, M.M.A.E., Semmrich, C., Zheng, L., Bartles, J.R., and Bausch, A.R. (2009). Structural and viscoelastic properties of actin networks formed by espin or pathologically relevant espin mutants. *Chemphyschem* *10*, 2813–2817.
- Ligon, L.A., Shelly, S.S., Tokito, M., and Holzbaur, E.L.F. (2003). The microtubule plus-end proteins EB1 and dynactin have differential effects on microtubule polymerization. *Mol. Biol. Cell* *14*, 1405–1417.
- Lindwall, G., and Cole, R.D. (1984). Phosphorylation affects the ability of tau protein to promote microtubule assembly. *J. Biol. Chem.* *259*, 5301–5305.
- Lisman, J., Schulman, H., and Cline, H. (2002). The molecular basis of CaMKII function in synaptic and behavioural memory. *Nat. Rev. Neurosci.* *3*, 175–190.
- Loveland, K.L., Herszfeld, D., Chu, B., Rames, E., Christy, E., Briggs, L.J., Shakri, R., de Kretser, D.M., and Jans, D.A. (1999). Novel low molecular weight microtubule-associated protein-2 isoforms contain a functional nuclear localization sequence. *J. Biol. Chem.* *274*, 19261–19268.
- Machesky, L.M., and Hall, A. (1996). Rho: a connection between membrane receptor signalling and the cytoskeleton. *Trends Cell Biol.* *6*, 304–310.
- Magdalena, J., Millard, T.H., Etienne-Manneville, S., Launay, S., Warwick, H.K., and Machesky, L.M. (2003). Involvement of the Arp2/3 complex and Scar2 in Golgi polarity in scratch wound models. *Mol. Biol. Cell* *14*, 670–684.
- Mandelkow, E.M., Mandelkow, E., and Milligan, R.A. (1991). Microtubule dynamics and microtubule caps: a time-resolved cryo-electron microscopy study. *J. Cell Biol.* *114*, 977–991.
- Matsuzaki, M., Honkura, N., Ellis-Davies, G.C.R., and Kasai, H. (2004). Structural basis of long-term potentiation in single dendritic spines. *Nature* *429*, 761–766.
- May, R.C., Caron, E., Hall, A., and Machesky, L.M. (2000). Involvement of the Arp2/3 complex in phagocytosis mediated by FcgammaR or CR3. *Nat. Cell Biol.* *2*, 246–248.
- Melki, R., Carlier, M.F., Pantaloni, D., and Timasheff, S.N. (1989). Cold depolymerization of microtubules to double rings: geometric stabilization of assemblies. *Biochemistry* *28*, 9143–9152.
- Melom, J.E., and Littleton, J.T. (2011). Synapse development in health and disease. *Curr. Opin. Genet. Dev.* *21*, 256–261.
- Meng, W., Mushika, Y., Ichii, T., and Takeichi, M. (2008). Anchorage of microtubule minus ends to adherens junctions regulates epithelial cell-cell contacts. *Cell* *135*, 948–959.
- Merenlender-Wagner, A., Pikman, R., Giladi, E., Andrieux, A., and Gozes, I. (2010). NAP (davunetide) enhances cognitive behavior in the STOP heterozygous mouse--a microtubule-deficient model of schizophrenia. *Peptides* *31*, 1368–1373.
- Mickey, B., and Howard, J. (1995). Rigidity of microtubules is increased by stabilizing agents. *J. Cell Biol.* *130*, 909–917.

- Miller, P.M., Folkmann, A.W., Maia, A.R.R., Efimova, N., Efimov, A., and Kaverina, I. (2009). Golgi-derived CLASP-dependent microtubules control Golgi organization and polarized trafficking in motile cells. *Nat. Cell Biol.* *11*, 1069–1080.
- Mitchison, T.J. (1993). Localization of an exchangeable GTP binding site at the plus end of microtubules. *Science* *261*, 1044–1047.
- Mitchison, T.J., and Kirschner, M.W. (1985a). Properties of the kinetochore in vitro. II. Microtubule capture and ATP-dependent translocation. *J. Cell Biol.* *101*, 766–777.
- Mitchison, T.J., and Kirschner, M.W. (1985b). Properties of the kinetochore in vitro. I. Microtubule nucleation and tubulin binding. *J. Cell Biol.* *101*, 755–765.
- Mitchison, T., and Kirschner, M. (1984a). Dynamic instability of microtubule growth. *Nature* *312*, 237–242.
- Mitchison, T., and Kirschner, M. (1984b). Microtubule assembly nucleated by isolated centrosomes. *Nature* *312*, 232–237.
- Mitra, A., and Sept, D. (2008). Taxol allosterically alters the dynamics of the tubulin dimer and increases the flexibility of microtubules. *Biophys. J.* *95*, 3252–3258.
- 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.
- Moore, A.T., Rankin, K.E., von Dassow, G., Peris, L., Wagenbach, M., Ovechkina, Y., Andrieux, A., Job, D., and Wordeman, L. (2005). MCAK associates with the tips of polymerizing microtubules. *J. Cell Biol.* *169*, 391–397.
- Moores, C.A., Perderiset, M., Francis, F., Chelly, J., Houdusse, A., and Milligan, R.A. (2004). Mechanism of microtubule stabilization by doublecortin. *Mol. Cell* *14*, 833–839.
- Moores, C.A., Perderiset, M., Kappeler, C., Kain, S., Drummond, D., Perkins, S.J., Chelly, J., Cross, R., Houdusse, A., and Francis, F. (2006). Distinct roles of doublecortin modulating the microtubule cytoskeleton. *EMBO J.* *25*, 4448–4457.
- Morishima-Kawashima, M., Hasegawa, M., Takio, K., Suzuki, M., Yoshida, H., Watanabe, A., Titani, K., and Ihara, Y. (1995). Hyperphosphorylation of tau in PHF. *Neurobiol. Aging* *16*, 365–371; discussion 371–380.
- Moritz, M., Braufeld, M.B., Sedat, J.W., Alberts, B., and Agard, D.A. (1995). Microtubule nucleation by gamma-tubulin-containing rings in the centrosome. *Nature* *378*, 638–640.
- Morris, J.R., and Lasek, R.J. (1982). Stable polymers of the axonal cytoskeleton: the axoplasmic ghost. *J. Cell Biol.* *92*, 192–198.
- Morrison, E.E. (2007). Action and interactions at microtubule ends. *Cell. Mol. Life Sci.* *64*, 307–317.
- 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.

- 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.
- 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.
- Neve, R.L., Harris, P., Kosik, K.S., Kurnit, D.M., and Donlon, T.A. (1986). Identification of cDNA clones for the human microtubule-associated protein tau and chromosomal localization of the genes for tau and microtubule-associated protein 2. *Brain Res.* *387*, 271–280.
- Noble, M., Lewis, S.A., and Cowan, N.J. (1989). The microtubule binding domain of microtubule-associated protein MAP1B contains a repeated sequence motif unrelated to that of MAP2 and tau. *J. Cell Biol.* *109*, 3367–3376.
- Nogales, E., Wolf, S.G., and Downing, K.H. (1998). Structure of the alpha beta tubulin dimer by electron crystallography. *Nature* *391*, 199–203.
- Nogales, E., Whittaker, M., Milligan, R.A., and Downing, K.H. (1999). High-resolution model of the microtubule. *Cell* *96*, 79–88.
- 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.* *22*, 2106–2114.
- Oakley, B.R., Oakley, C.E., Yoon, Y., and Jung, M.K. (1990). Gamma-tubulin is a component of the spindle pole body that is essential for microtubule function in *Aspergillus nidulans*. *Cell* *61*, 1289–1301.
- O'Brien, E.T., Voter, W.A., and Erickson, H.P. (1987). GTP hydrolysis during microtubule assembly. *Biochemistry* *26*, 4148–4156.
- Oddoux, S., Zaal, K.J., Tate, V., Kenea, A., Nandkeolyar, S.A., Reid, E., Liu, W., and Ralston, E. (2013). Microtubules that form the stationary lattice of muscle fibers are dynamic and nucleated at Golgi elements. *J. Cell Biol.* *203*, 205–213.
- 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.
- Olmsted, J.B. (1986). Microtubule-associated proteins. *Annu. Rev. Cell Biol.* *2*, 421–457.
- Olmsted, J.B., and Borisy, G.G. (1975). Ionic and nucleotide requirements for microtubule polymerization in vitro. *Biochemistry* *14*, 2996–3005.

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.

Pampaloni, F., Lattanzi, G., Jonás, A., Surrey, T., Frey, E., and Florin, E.-L. (2006). Thermal fluctuations of grafted microtubules provide evidence of a length-dependent persistence length. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* *103*, 10248–10253.

Peng, J., Kim, M.J., Cheng, D., Duong, D.M., Gygi, S.P., and Sheng, M. (2004). Semiquantitative proteomic analysis of rat forebrain postsynaptic density fractions by mass spectrometry. *J. Biol. Chem.* *279*, 21003–21011.

Perez, F., Diamantopoulos, G.S., Stalder, R., and Kreis, T.E. (1999). CLIP-170 highlights growing microtubule ends in vivo. *Cell* *96*, 517–527.

Pierce, J.P., van Leyen, K., and McCarthy, J.B. (2000). Translocation machinery for synthesis of integral membrane and secretory proteins in dendritic spines. *Nat. Neurosci.* *3*, 311–313.

Pierce, J.P., Mayer, T., and McCarthy, J.B. (2001). Evidence for a satellite secretory pathway in neuronal dendritic spines. *Curr. Biol.* *11*, 351–355.

Pierre, P., Scheel, J., Rickard, J.E., and Kreis, T.E. (1992). CLIP-170 links endocytic vesicles to microtubules. *Cell* *70*, 887–900.

Pilz, D.T., Matsumoto, N., Minnerath, S., Mills, P., Gleeson, J.G., Allen, K.M., Walsh, C.A., Barkovich, A.J., Dobyns, W.B., Ledbetter, D.H., et al. (1998). LIS1 and XLIS (DCX) mutations cause most classical lissencephaly, but different patterns of malformation. *Hum. Mol. Genet.* *7*, 2029–2037.

Pirolet, F., Rauch, C.T., Job, D., and Margolis, R.L. (1989). Monoclonal antibody to microtubule-associated STOP protein: affinity purification of neuronal STOP activity and comparison of antigen with activity in neuronal and nonneuronal cell extracts. *Biochemistry* *28*, 835–842.

Pirolet, F., Margolis, R.L., and Job, D. (1992). Ca(2+)-calmodulin regulated effectors of microtubule stability in neuronal tissues. *Biochim. Biophys. Acta* *1160*, 113–119.

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.

des Portes, V., Francis, F., Pinard, J.M., Desguerre, I., Moutard, M.L., Snoeck, I., Meiners, L.C., Capron, F., Cusmai, R., Ricci, S., et al. (1998). doublecortin is the major gene causing X-linked subcortical laminar heterotopia (SCLH). *Hum. Mol. Genet.* *7*, 1063–1070.

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.

Powell, K.J., Hori, S.E., Leslie, R., Andrieux, A., Schellinck, H., Thorne, M., and Robertson, G.S. (2007). Cognitive impairments in the STOP null mouse model of schizophrenia. *Behav. Neurosci.* *121*, 826–835.

Pring, M., Weber, A., and Bubb, M.R. (1992). Profilin-actin complexes directly elongate actin filaments at the barbed end. *Biochemistry* *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* *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.

Pryer, N.K., Walker, R.A., Skeen, V.P., Bourns, B.D., Soboeiro, M.F., and Salmon, E.D. (1992). Brain microtubule-associated proteins modulate microtubule dynamic instability in vitro. Real-time observations using video microscopy. *J. Cell. Sci.* *103* (Pt 4), 965–976.

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.

Ramón y Cajal, S. Estructura de los centros nerviosos de las aves. *Rev. Trim. Histol. Norm. Pat.* *1*, 1-10 (1888).

Reymann, A.-C., Suarez, C., Guérin, C., Martiel, J.-L., Staiger, C.J., Blanchoin, L., and Boujemaa-Paterski, R. (2011). Turnover of branched actin filament networks by stochastic fragmentation with ADF/cofilin. *Mol. Biol. Cell* *22*, 2541–2550.

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.

Rickard, J.E., and Kreis, T.E. (1991). Binding of pp170 to microtubules is regulated by phosphorylation. *J. Biol. Chem.* *266*, 17597–17605.

Rivero, S., Cardenas, J., Bornens, M., and Rios, R.M. (2009). Microtubule nucleation at the cis-side of the Golgi apparatus requires AKAP450 and GM130. *EMBO J.* *28*, 1016–1028.

Rochlin, M.W., Dailey, M.E., and Bridgman, P.C. (1999). Polymerizing microtubules activate site-directed F-actin assembly in nerve growth cones. *Mol. Biol. Cell* *10*, 2309–2327.

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. *Nat. 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.

Rogers, S.L., Rogers, G.C., Sharp, D.J., and Vale, R.D. (2002). Drosophila EB1 is important for proper assembly, dynamics, and positioning of the mitotic spindle. *J. Cell Biol.* *158*, 873–884.

- Roll-Mecak, A., and Vale, R.D. (2008). Structural basis of microtubule severing by the hereditary spastic paraplegia protein spastin. *Nature* *451*, 363–367.
- 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. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* *105*, 7445–7450.
- Ross, C.A., Margolis, R.L., Reading, S.A.J., Pletnikov, M., and Coyle, J.T. (2006). Neurobiology of schizophrenia. *Neuron* *52*, 139–153.
- Roubin, R., Acquaviva, C., Chevrier, V., Sedjaï, F., Zyss, D., Birnbaum, D., and Rosnet, O. (2013). Myomegalin is necessary for the formation of centrosomal and Golgi-derived microtubules. *Biol Open* *2*, 238–250.
- 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.
- Santarella, R.A., Skiniotis, 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.
- 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.
- Schaefer, A.W., Kabir, N., and Forscher, P. (2002). 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, M.K.E., Schmalbruch, H., Buhler, E., Lopez, C., Martin, N., Guénet, J.-L., and Haase, G. (2007). Progressive motor neuronopathy: a critical role of the tubulin chaperone TBCE in axonal tubulin routing from the Golgi apparatus. *J. Neurosci.* *27*, 8779–8789.
- Scheel, J., Pierre, P., Rickard, J.E., Diamantopoulos, G.S., Valetti, C., van der Goot, F.G., Häner, M., Aebi, U., and Kreis, T.E. (1999). Purification and analysis of authentic CLIP-170 and recombinant fragments. *J. Biol. Chem.* *274*, 25883–25891.
- 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.* *9*, 1712–1730.
- Schuylar, S.C., and Pellman, D. (2001). Microtubule “plus-end-tracking proteins”: The end is just the beginning. *Cell* *105*, 421–424.
- Scott, C.W., Klika, A.B., Lo, M.M., 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.

- Sedeh, R.S., Fedorov, A.A., Fedorov, E.V., Ono, S., Matsumura, F., Almo, S.C., and Bathe, M. (2010). Structure, evolutionary conservation, and conformational dynamics of *Homo sapiens* fascin-1, an F-actin crosslinking protein. *J. Mol. Biol.* *400*, 589–604.
- Segal, M. (2005). Dendritic spines and long-term plasticity. *Nat. Rev. Neurosci.* *6*, 277–284.
- Seubert, P., Mawal-Dewan, M., Barbour, R., Jakes, R., Goedert, M., Johnson, G.V., Littersky, J.M., Schenk, D., Lieberburg, I., and Trojanowski, J.Q. (1995). Detection of phosphorylated Ser262 in fetal tau, adult tau, and paired helical filament tau. *J. Biol. Chem.* *270*, 18917–18922.
- 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.
- Skau, C.T., Courson, D.S., Bestul, A.J., Winkelman, J.D., Rock, R.S., Sirotnik, 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* *15*, 4497–4505.
- Soltys, B.J., and Borisy, G.G. (1985). Polymerization of tubulin in vivo: direct evidence for assembly onto microtubule ends and from centrosomes. *J. Cell Biol.* *100*, 1682–1689.
- 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.
- Stoothoff, W.H., and Johnson, G.V.W. (2005). Tau phosphorylation: physiological and pathological consequences. *Biochim. Biophys. Acta* *1739*, 280–297.
- Su, L.K., Burrell, M., Hill, D.E., Gyuris, J., Brent, R., Wiltshire, R., Trent, J., Vogelstein, B., and Kinzler, K.W. (1995). APC binds to the novel protein EB1. *Cancer Res.* *55*, 2972–2977.
- 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.* *15*, 1820–1826.
- 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.

- Takei, Y., Kikkawa, Y.S., Atapour, N., Hensch, T.K., and Hirokawa, N. (2015). Defects in Synaptic Plasticity, Reduced NMDA-Receptor Transport, and Instability of Postsynaptic Density Proteins in Mice Lacking Microtubule-Associated Protein 1A. *J. Neurosci.* *35*, 15539–15554.
- Tanaka, N., Meng, W., Nagae, S., and Takeichi, M. (2012). Nezha/CAMSAP3 and CAMSAP2 cooperate in epithelial-specific organization of noncentrosomal microtubules. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* *109*, 20029–20034.
- Tanaka, T., Serneo, F.F., Tseng, H.C., Kulkarni, A.B., Tsai, L.H., and Gleeson, J.G. (2004). Cdk5 phosphorylation of doublecortin ser297 regulates its effect on neuronal migration. *Neuron* *41*, 215–227.
- Taylor, K.R., Holzer, A.K., Bazan, J.F., Walsh, C.A., and Gleeson, J.G. (2000). Patient mutations in doublecortin define a repeated tubulin-binding domain. *J. Biol. Chem.* *275*, 34442–34450.
- 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.
- 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.
- Tirnauer, J.S., O'Toole, E., Berrueta, L., Bierer, B.E., and Pellman, D. (1999). Yeast Bim1p promotes the G1-specific dynamics of microtubules. *J. Cell Biol.* *145*, 993–1007.
- Tirnauer, J.S., Grego, S., Salmon, E.D., and Mitchison, T.J. (2002). EB1-microtubule interactions in Xenopus egg extracts: role of EB1 in microtubule stabilization and mechanisms of targeting to microtubules. *Mol. Biol. Cell* *13*, 3614–3626.
- 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.
- Toni, N., Buchs, P.A., Nikonenko, I., Bron, C.R., and Muller, D. (1999). LTP promotes formation of multiple spine synapses between a single axon terminal and a dendrite. *Nature* *402*, 421–425.
- Toro, R., Konyukh, M., Delorme, R., Leblond, C., Chaste, P., Fauchereau, F., Coleman, M., Leboyer, M., Gillberg, C., and Bourgeron, T. (2010). Key role for gene dosage and synaptic homeostasis in autism spectrum disorders. *Trends Genet.* *26*, 363–372.
- Trinczek, B., Biernat, J., Baumann, K., Mandelkow, E.M., and Mandelkow, E. (1995). Domains of tau protein, differential phosphorylation, and dynamic instability of microtubules. *Mol. Biol. Cell* *6*, 1887–1902.
- Trivedi, N., Marsh, P., Goold, R.G., Wood-Kaczmar, A., and Gordon-Weeks, P.R. (2005). Glycogen synthase kinase-3beta phosphorylation of MAP1B at Ser1260 and Thr1265 is spatially restricted to growing axons. *J. Cell. Sci.* *118*, 993–1005.

- Tsukada, M., Prokscha, A., Oldekamp, J., and Eichele, G. (2003). Identification of neurabin II as a novel doublecortin interacting protein. *Mech. Dev.* *120*, 1033–1043.
- Tucker, R.P., and Matus, A.I. (1987). Developmental regulation of two microtubule-associated proteins (MAP2 and MAP5) in the embryonic avian retina. *Development* *101*, 535–546.
- Uversky, V.N. (2002). What does it mean to be natively unfolded? *Eur. J. Biochem.* *269*, 2–12.
- Vaillant, A.R., Müller, R., Langkopf, A., and Brown, D.L. (1998). Characterization of the microtubule-binding domain of microtubule-associated protein 1A and its effects on microtubule dynamics. *J. Biol. Chem.* *273*, 13973–13981.
- Vale, R.D., Reese, T.S., and Sheetz, M.P. (1985). Identification of a Novel Force-Generating Protein, Kinesin, Involved in Microtubule-Based Motility. *Cell* *42*, 39–50.
- Valiron, O., Arnal, I., Caudron, N., and Job, D. (2010). GDP-tubulin incorporation into growing microtubules modulates polymer stability. *J. Biol. Chem.* *285*, 17507–17513.
- 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.
- Vandecanlaere, A., Pedrotti, B., Utton, M.A., Calvert, R.A., and Bayley, P.M. (1996). Differences in the regulation of microtubule dynamics by microtubule-associated proteins MAP1B and MAP2. *Cell Motil. Cytoskeleton* *35*, 134–146.
- Vinogradova, T., Paul, R., Grimaldi, A.D., Loncarek, J., Miller, P.M., Yampolsky, D., Magidson, V., Khodjakov, A., Mogilner, A., and Kaverina, I. (2012). Concerted effort of centrosomal and Golgi-derived microtubules is required for proper Golgi complex assembly but not for maintenance. *Mol. Biol. Cell* *23*, 820–833.
- 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.
- Voter, W.A., and Erickson, H.P. (1984). The kinetics of microtubule assembly. Evidence for a two-stage nucleation mechanism. *J. Biol. Chem.* *259*, 10430–10438.
- Vouyiouklis, D.A., and Brophy, P.J. (1995). Microtubule-associated proteins in developing oligodendrocytes: transient expression of a MAP2c isoform in oligodendrocyte precursors. *J. Neurosci. Res.* *42*, 803–817.
- 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., Chrétien, D., and Job, D. (1990). Characterization of microtubule protofilament numbers. How does the surface lattice accommodate? *J. Mol. Biol.* *212*, 775–786.
- Wang, H., Wang, Z., Wang, S., Li, M., Nan, L., Rhie, J.K., Covey, J.M., Zhang, R., and Hill, D.L. (2005). Preclinical pharmacology of epothilone D, a novel tubulin-stabilizing antitumor agent. *Cancer Chemother. Pharmacol.* *56*, 255–260.

- Wang, J.Z., Grundke-Iqbali, I., and Iqbal, K. (1996). 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, Z., Zhang, C., and Qi, R.Z. (2014). A newly identified myomegalin isoform functions in Golgi microtubule organization and ER-Golgi transport. *J. Cell. Sci.* 127, 4904–4917.
- 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, N., and Higashida, C. (2004). Formins: processive cappers of growing actin filaments. *Exp. Cell Res.* 301, 16–22.
- Webb, B.C., and Wilson, L. (1980). Cold-stable microtubules from brain. *Biochemistry* 19, 1993–2001.
- Wegner, A. (1976). Head to tail polymerization of actin. *J. Mol. Biol.* 108, 139–150.
- Weigt, C., Schoepper, B., and Wegner, A. (1990). Tropomyosin-troponin complex stabilizes the pointed ends of actin filaments against polymerization and depolymerization. *FEBS Lett.* 260, 266–268.
- Weingarten, M.D., Lockwood, A.H., Hwo, S.Y., and Kirschner, M.W. (1975). 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). *Development* 116, 1151–1161.
- Wong, M., and Guo, D. (2013). Dendritic spine pathology in epilepsy: cause or consequence? *Neuroscience* 251, 141–150.
- Xu, K., Zhong, G., and Zhuang, X. (2013). Actin, spectrin, and associated proteins form a periodic cytoskeletal structure in axons. *Science* 339, 452–456.
- 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.* 56, 547–556.
- Yau, K.W., van Beuningen, S.F.B., Cunha-Ferreira, I., Cloin, B.M.C., van Battum, E.Y., Will, L., Schätzle, P., Tas, R.P., van Krugten, J., Katrukha, E.A., et al. (2014a). Microtubule Minus-End Binding Protein CAMSAP2 Controls Axon Specification and Dendrite Development. *Neuron* 82, 1058–1073.
- Yau, K.W., van Beuningen, S.F.B., Cunha-Ferreira, I., Cloin, B.M.C., van Battum, E.Y., Will, L., Schätzle, P., Tas, R.P., van Krugten, J., Katrukha, E.A., et al. (2014b). Microtubule Minus-End Binding Protein CAMSAP2 Controls Axon Specification and Dendrite Development. *Neuron* 82, 1058–1073.
- Zaal, K.J.M., Reid, E., Mousavi, K., Zhang, T., Mehta, A., Bugnard, E., Sartorelli, V., and Ralston, E. (2011). Who needs microtubules? Myogenic reorganization of MTOC, Golgi complex and ER exit sites persists despite lack of normal microtubule tracks. *PLoS ONE* 6, e29057.

Zauner, W., Kratz, J., Staunton, J., Feick, P., and Wiche, G. (1992). Identification of two distinct microtubule binding domains on recombinant rat MAP 1B. *Eur. J. Cell Biol.* 57, 66–74.

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.

Résumé

Le cytosquelette d'une cellule eucaryote est constitué de trois types de polymères différents qui sont l'actine, les filaments intermédiaires et les microtubules. Ces éléments confèrent à la cellule l'essentiel de ses propriétés mécaniques telles que le maintien de l'architecture ou la modification de sa forme pour permettre le déplacement cellulaire. Ils sont également impliqués dans le transport d'organites ou de nutriments d'un bout à l'autre de la cellule, dans la ségrégation des chromosomes lors de la mitose ou encore dans le processus de division cellulaire. Pour répondre aux différents besoins de la cellule, ces filaments sont extrêmement dynamiques et peuvent se désassembler pour se réassembler à un autre endroit de la cellule. Cette dynamicité est régulée par de nombreuses protéines accessoires qui vont être capables de modifier les propriétés intrinsèques des différents filaments (dynamique, mécanique et organisatrice). Parmi ces protéines régulatrices, l'on distingue tout particulièrement les MAPs, pour Microtubule Associated Proteins, capables de modifier la dynamique et la structure des microtubules. MAP6, ou encore STOP pour Stable Tubule Only Peptide, est une MAP neuronale qui fut initialement décrite pour sa capacité à protéger les microtubules d'une exposition au froid ou encore de drogues dépolymérisantes comme le nocodazole. Des souris déléteées pour le gène MAP6 montrent des troubles cognitifs et comportementaux proches des patients atteints de schizophrénie, impliquant au moins en partie des défauts de stabilisation des microtubules. Cependant, les effets de la protéine sur les microtubules restaient encore à déterminer. Dans ce contexte, à l'aide de diverses approches biochimiques et vidéomicroscopiques, nous avons montré que la protéine MAP6 est capable d'interagir de façon directe avec les microtubules *in vitro* et permet leur stabilisation. Elle permet aussi de réguler la dynamique des microtubules en augmentant la vitesse de polymérisation de l'extrémité (+), de diminuer la fréquence de catastrophe et l'apparition d'événements de sauvetage, de façon similaire à d'autres MAPs comme Tau ou MAP2. Cependant, contrairement aux autres MAPs, nous avons montré que MAP6 présente une dualité d'action sur le bout (-) des microtubules en diminuant et figeant très rapidement la dynamique de cette extrémité. Cette dualité pourrait ainsi conférer à MAP6 un rôle essentiel de nucléateur de microtubules en figeant l'extrémité (-) du microtubule et en favorisant la polymérisation et la stabilisation de l'extrémité (+). De plus, la protéine MAP6 est capable de modifier fortement la structure des microtubules. De part leur composition et leur rôle, les microtubules sont les éléments les plus rigides du cytosquelette et forment naturellement un tube creux linéaire. Or en présence de MAP6, les microtubules perdent cet aspect linéaire et adoptent une structure hélicoïdale (avec un pas d'environ 4,5 µm et une hauteur d'environ 1 µm) qui n'avait encore jamais été observée jusqu'à présent. La présence d'une telle population de microtubules dans la cellule pourrait ainsi apporter une certaine résistance mécanique ou encore permettre le maintien de l'architecture de l'axone. Enfin, nous avons montré que MAP6 peut aussi interagir de façon directe avec les filaments d'actines et les associer entre eux pour former des faisceaux. Dans les neurones, de nombreuses molécules ont été identifiées comme étant des régulateurs clés dans le « crosstalk » entre les filaments d'actines et les microtubules. L'interaction et la coordination entre les différents éléments du cytosquelette jouent un rôle essentiel dans la transmission et le relais du message synaptique. MAP6 pourrait être importante pour l'ensemble de ces mécanismes ce qui expliquerait les défauts de plasticité synaptique ainsi que les défauts cognitifs observés chez les souris KO MAP6.

Summary

The eukaryotic cell's cytoskeleton is constituted by three types of different polymers which are the actin filaments, the intermediate filaments and the microtubules. These elements confer on the cell the main part of its mechanical properties such as the architecture preservation or the modification of its shape to allow the cellular movement. They are also involved in the organelles or nutrients transport throughout the cell, in the chromosomes segregation during mitosis or still in the cellular division process. To answer the cell's various needs, these filaments are extremely dynamics and are able to dis-assemble to re-assemble in another place of the cell. This dynamic is regulated by numerous proteins which are going to be capable of modifying the intrinsic properties of the different filaments (dynamic, mechanic and structure). Among them are present the MAPs, for Microtubule-Associated Proteins, which will be able to influence the microtubule dynamics and structure. MAP6, also known as STOP for Stable Tubule Only Peptide, is a neuronal MAP which was initially described for its capacity to protect microtubule from cold or nocodazole exposure. KO MAP6 mice display cognitive and behavioral disorders close to patient with schizophrenia, involving at least partially microtubules stabilization defects. However, the effects of the protein on the microtubules still remained to determine. In this context, using diverse biochemical and videomicroscopy technics, we showed that MAP6 is able to directly interact *in vitro* with the microtubules and stabilizes them. It also regulates the microtubule dynamics by increasing the microtubule growth rate of the plus end extremity, decreases the shrinkage frequency and allows rescue of shrinking microtubules, similarly to other MAPs like Tau or MAP2. However, contrary to the other MAPs, we showed that MAP6 has another effect on the microtubule (-) end by decreasing and freezing its dynamics. This dual effect could confer to MAP6 an essential role of microtubules nucleation by stabilizing the new formed microtubule (-) end and by stabilizing and increasing the (+) end microtubule growth rate. Furthermore, MAP6 is also able to strongly modify the microtubule structure. Microtubules are the stiffest elements of the cytoskeleton and naturally form due to their composition linear hollow tubes. Yet in presence of MAP6, microtubules lose their usual shape and adopt a helical structure (4,5 µm pitch and approximately 1 µm thickness) which had never been observed until now. The presence of such a population of microtubules in the neuron could thus provide a mechanical strength and allow the preservation of the axon architecture. Finally, we showed that MAP6 can also directly interact with the actin filaments to associate them and form bundles. In neurons, several molecules have been identified as key regulators in the "crosstalk" between actin filaments and microtubules. The interaction and coordination between the different cytoskeletal elements play a vital role in the synaptic transmission. MAP6 may be important for all these mechanisms which would explain the synaptic plasticity and cognitive defects observed in KO MAP6 mice.