



HAL
open science

Régulation de la dynamique des microtubules par la kinase de stress JNK dans les cellules épithéliales : caractérisation de CLIP-170 comme un nouveau substrat.

Hélène Henrie

► To cite this version:

Hélène Henrie. Régulation de la dynamique des microtubules par la kinase de stress JNK dans les cellules épithéliales : caractérisation de CLIP-170 comme un nouveau substrat.. Biologie moléculaire. Université Paris Saclay (COMUE), 2017. Français. NNT : 2017SACLS461 . tel-01780456

HAL Id: tel-01780456

<https://theses.hal.science/tel-01780456v1>

Submitted on 27 Apr 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.

Régulation de la dynamique des microtubules par la kinase de stress JNK dans les cellules épithéliales : caractérisation de CLIP-170 comme un nouveau substrat.

Thèse de doctorat de l'Université Paris-Saclay,
préparée à l'Université Paris-Sud

École doctorale n°569 Innovation thérapeutique :
du fondamental à l'appliqué (ITFA)
Spécialité de doctorat : Physiologie, physiopathologie

Thèse présentée et soutenue à Châtenay-Malabry,
le 15 décembre 2017, par

Hélène Henrie

Composition du Jury :

- | | |
|---|------------------------|
| Mme Sandrine Etienne-Manneville | Présidente |
| Directeur de Recherche, Institut Pasteur (CNRS UMR 3691 – Cell Polarity, Migration and Cancer Unit) | |
| Mme Anne Fourest-Lieuvin | Rapporteur |
| Chargé de Recherche, Institut des neurosciences de Grenoble (Équipe GIN : Dynamique et structure du cytosquelette) | |
| Mme Sylvia Soares | Rapporteur |
| Maître de Conférences, Institut de Biologie Paris Seine (UMR 8246 – Équipe : régénération et croissance de l'axone) | |
| M. Franck Perez | Examineur |
| Directeur de Recherche, Institut Curie (UMR144 – Compartimentation et dynamique cellulaire) | |
| M. Christian Poüs | Directeur de thèse |
| PU-PH, UFR de Pharmacie (INSERM UMR-S-1193 – Mécanismes cellulaires et moléculaires de l'adaptation au stress et cancérogenèse) | |
| Mme Béatrice Benoit | Co-Directrice de thèse |
| Maître de Conférences, UFR de Pharmacie (INSERM UMR-S-1193 – Mécanismes cellulaires et moléculaires de l'adaptation au stress et cancérogenèse) | |

À André
À Pierre



Remerciements

Tout d'abord, je tiens à remercier les docteurs Anne Fourest-Lieuvin et Sylvia Soares pour avoir accepté de lire mon manuscrit, ainsi que d'avoir accepté d'être rapporteurs de ma thèse. Je remercie aussi les autres membres du jury, les docteurs Sandrine Etienne-Manneville et Franck Perez pour avoir accepté d'examiner mon travail de thèse. Je souhaite également remercier le docteur Anne Fourest-Lieuvin pour ses conseils enrichissants lors de mon comité de thèse en juin 2016 et d'avoir su m'écouter et me comprendre.

Merci au Professeur Christian Poüs de m'avoir accordé sa confiance en m'accueillant dans son laboratoire afin de me donner l'opportunité de réaliser cette thèse. Merci également à ma co-directrice de thèse Béatrice Benoit pour avoir toujours su trouver du temps pour moi tout au long de ces trois années. Merci pour ton aide et tes conseils, aussi bien technique que scientifique que tu m'as apporté lors des manipulations. Et enfin merci à Antoine Pilon mon co-encadrant pour tous les conseils que tu m'as apporté. Merci à eux trois pour les discussions scientifiques que nous avons eu, votre précieuse aide dans l'écriture de mon manuscrit de thèse ainsi que l'élaboration des posters et des présentations scientifiques. Je tiens à vous adresser un grand merci pour m'avoir aidé à développer ma rigueur scientifique, mon esprit scientifique tout en apprenant de nouvelles techniques. Je souhaite également vous remercier pour avoir accepté que je sois monitrice pendant cette période, car j'ai adoré ! Finalement, je suis très reconnaissante du savoir-faire que vous m'avez transmis mais aussi de l'ouverture scientifique que vous m'avez permis d'acquérir.

Par ailleurs, je suis reconnaissante à l'ensemble des personnes du laboratoire pour leur ambiance de travail agréable, ainsi que pour leur disponibilité et leur aide lors des manipulations, mais aussi pour les échanges que j'ai pu entretenir avec eux. Je pense notamment à Phillippe Billiald pour toutes les discussions que nous avons eues et pour ton soutien lors de la rédaction de mon manuscrit de thèse. Merci aussi à Claude Mariette, Ameetha Ratier, Anita Baillet et Isabelle Cantaloube pour votre disponibilité, vos réponses à mes questions et nos discussions variées. Je tiens plus particulièrement à remercier Isabelle Cantaloube pour ton aide précieuse dans cette dernière année de thèse à propos des manipulations, mais aussi pour ton professionnalisme et ton soutien tout au long de ces trois années de thèse, en m'encourageant tout en aillant une oreille attentive envers moi.

Merci à Benjamin Targa, j'ai eu l'honneur de partager mon bureau avec toi, mais j'ai surtout partagé tes sottises (mon cahier en a notamment souffert) ! Merci pour ton soutien, ton écoute, nos nombreuses discussions et surtout ton humour qui m'a aidé à tenir bon, tu es un mec super et rassure toi, j'ai pris soin de Dickbutt...

Merci aussi aux membres de l'ADIT pour tous les bons moments que nous avons partagé, aussi bien dans les réunions pour préparer les JEDs que lors des sorties pour décompresser. Un grand merci à Chloé, Mathilde et Sophie (les PhD dansers) pour votre

écoute, votre soutien et surtout d'être des filles géniales. Vous êtes au top 😊. J'espère que nous resterons en contact dans les années à venir ! Finalement, on y est arrivé !

Je n'oublie pas les stagiaires qui sont passés par le bureau 124 pour leur sympathie et la bonne ambiance qu'ils ont apportés, ainsi que pour les sorties que nous avons pu réaliser ensemble.

Je souhaite aussi remercier toutes les personnes rencontrées au cours de ma formation, en commençant par Nathalie Bellec qui m'a fait découvrir et aimer le métier d'enseignant-chercheur, en m'accueillant comme stagiaire dans son laboratoire où elle travaille. Puis viennent Estelle Galienne et Sylvain Bourgerie qui m'ont confortée dans mon choix d'étude. Et enfin Hélène Benedetti et Reine Nehmé pour avoir cru en moi et m'avoir encouragé à persévérer dans cette voie professionnelle. Sans oublier Béatrice Vallée qui a toujours su être présente par ses messages d'encouragements, son soutien moral et ses conseils enrichissants dans les moments difficiles. J'ai découvert à travers toi une confidente inestimable.

Pour finir, je tiens vivement à remercier ma famille en or car chacun à sa façon a su m'apporter son aide. J'ai beaucoup de chance de vous avoir auprès de moi. Je pense à Maman qui a toujours été attentive et qui a su me reconforter aussi bien avec des mots, qu'avec des chouquettes ou du chocolat. Mais aussi Marcel qui n'est jamais loin et toujours prêt à rendre service. Vous êtes formidables ! Il y a également Éric, pour ton soutien notamment pendant la période de rédaction, ainsi que Loïc pour toutes les musiques que tu m'as fait découvrir et qui ont rythmé ma thèse. Elles raisonneront encore longtemps dans ma tête je pense ! Merci aussi à Papa et Annick, pour votre écoute et les très bons moments de bonheur partagé. Sans oublier André, je ne te remercierais jamais assez d'avoir permis à Nathalie d'entrer dans ma vie. Nathalie, et oui encore toi. Je suis sûr que si tu n'avais pas été aussi présente et à mon écoute je n'en serais pas là où j'en suis aujourd'hui ! Je tiens également à remercier Yvon et Léa pour m'avoir accepté dans leur vie à travers Nathalie. Un grand merci à vous tous pour votre amour. Je vous aime tous très fort ! ♥♥♥

Bien sûr, je n'oublie pas mon chéri qui a quotidiennement su m'aider, m'écouter et me conseiller. Je tiens notamment à te remercier d'avoir accepté de vivre des soirées écourtées et peu de sorties le weekend pour cause de travail ou fatigue ! Je pense que je ne te remercierais jamais assez pour tout ce que tu m'apportes. Je n'ai pas de mots suffisamment forts pour t'exprimer à quel point je tiens à toi. Je t'aime ♥♥♥

Merci également à ma belle-famille pour votre soutien, votre écoute et tous les bons moments partagés. Vous êtes supers !

Malheureusement, Pépé, Mémé, Mamie & Pépé de cœur vous n'aurez pas pu voir l'aboutissement de ces trois années de travail, mais je suis sûre que vous étiez sereins pour moi. N'est-ce pas Mamie « comme d'habitude je ne vais pas y arriver » ! Merci à Papy pour les bons moments que nous avons partagé aussi bien au Louvre que chez toi !

Un grand merci à mes amis pour votre soutien et votre écoute, ainsi que tous les très bons moments de joie partagés, à Lille, l'île de Ré, Poitiers ou Paris...

Liste des abréviations

Dans cette liste, les abréviations fréquemment utilisées sont répertoriées, tandis que les abréviations peu employées sont explicitées dans le texte.

(+) : plus	typique des protéines associées au cytosquelette)
+TIP(s) : plus-end Tracking Protein(s)	CC : <i>Coiled Coil</i>
(-) : moins	Cdk1 : Cyclin-dependent kinase 1
aa : acide aminé	CENP-E : Centromere-associated Protein E
Ac : Anticorps	ch-TOG : colonic and hepatic Tumor Overexpressed Gene
ADN(p) : Acide Désoxyribo Nucléique (plasmidique)	CLASP(s) : Cytoplasmic Linker protein (CLIP)-Associated Protein(s)
Ala (A) : Alanine (acide aminé)	CLIP(s) : Cytoplasmic Linker Protein(s)
AMPc : Adénosine Monophosphate cyclique	CLIP-170 : Cytoplasmic Linker Protein of 170 kDa
AMPK : AMP-activated Protein Kinase	CLIP-115 : Cytoplasmic Linker Protein of 115 kDa
APC : Adenomatous Polyposis Coli protein	Cys (C) : Cystéine (acide aminé)
Arg (R) : Arginine (acide aminé)	DCX : Doublecortine
ARN : Acide Ribo Nucléique	DMEM : Dubecco's Modified Eagle Medium
Asn (N) : Asparagine (acide aminé)	EB(s) : End Binding protein(s)
Asp (D) : Acide aspartique, aspartate (acide aminé)	EB1 : End Binding protein 1
ATP : Adenosine Tri-Phosphate	EEY/F : Glu-Glu-Tyr/Phe
βGP : β-Glycérophosphate	ERK : Extracellular signal-Regulated Kinase
B/L : Benzamidine/Leuceptine	GDP : Guanosine Di-Phosphate
βMe : β-Mercaptoéthanol	GFP : Green Fluorescent Protein (étiquette protéique fluorescente verte)
BSA : Bovin Serum Albumin	Gln (Q) : Glutamine (acide aminé)
Ca²⁺ : Calcium / CaCl₂ : Chlorure de Calcium	
CAP-Gly : Cytoskeletal-Associated Protein Glycine-rich (domaine riche en Glycine)	

Glu (E) : Acide glutamique, glutamate (acide aminé)

Gly (G) : Glycine (acide aminé)

GMPCPP : guanylyl-(alpha,beta)-methylene-diphosphonate (analogue du GTP lentement hydrolysable)

GSK3(β) : Glycogen Synthase Kinase 3(β)

GST : Glutathione S-Transferase

GTP : Guanosine Tri-Phosphate

HeLa : Henrietta Lacks cells (cellules épithéliales de l'ovaire cancéreuses)

His (H) : Histidine (acide aminé)

Ile (I) : Isoleucine (acide aminé)

IQGAP1 : IQ motif containing GTPase Activating Protein 1

JIP(s) : JNK-Interacting Protein(s)

JNK(s) : c-Jun N-terminal Kinase(s)

kb : kilo bases

kDa : kilo Dalton

KHC(s) : Kinesin Heavy Chain(s) (chaîne lourde de la kinésine)

KIF(s) : Kinesin Family protein(s) (protéine de la famille des kinésines)

KLC(s) : Kinesin Light Chain(s) (chaîne légère de la kinésine)

KO : *Knockout*

LB : Luria Bertani (milieu de bactériologie)

Leu (L) : Leucine (acide aminé)

LIS1 : Lissencephaly 1

LPS : Lipopolysaccharide

LxxPTPh : Leucine-acide aminé quelconque-acide aminé quelconque-Proline-Thréonine-Proline-acide aminé hydrophobe

Lys (K) : Lysine (acide aminé)

MAP(s) : Microtubule-Associated Protein(s)

MAPK(s) : Mitogen-Activated Protein Kinase(s)

MAPKK (MKK) : Mitogen-Activated protein Kinase Kinase

MAPKKK : MAP Kinase Kinase Kinase

MCAK : Mitotic Centromere-Associated Kinesin

Met (M) : Méthionine (acide aminé)

MgCl₂ : Magnésium

MKP(s) : MAP (Mitogen-Activated Protein) Kinase Phosphatase(s)

MPT(s) : Modifications Post-traductionnelle(s)

MT(s) : Microtubule(s)

MTA(s) : Microtubule-Targeting Agent(s)

MTBR : Microtubule Binding Region

MTOC(s) : Microtubule-Organizing Center(s), centre organisateur des microtubules

NaCl : Chlorure de Sodium

NaF : Fluorure de Sodium

Na₃VO₄ : Ortho-vanadate (OVA)

nMTOC(s) : non-centrosomale Microtubule Organizing Center(s)

NP-40 : Nonidet P-40

O/N : overnight

P : Phosphate

PBS : Phosphate-Buffered Saline (tampon phosphate salin)

PCR : Polymerase Chain Reaction

PEM : PIPES-EGTA-MgCl₂ (tampon préservant le cytosquelette)

PFA : Paraformaldéhyde

Phe (F) : Phénylalanine (acide aminé)

PKA : cAMP-dependent Protein Kinase A

PMSF : fluorure de phénylméthylsulfonyle

pNPP : paranitrophényl phosphate

PRK/PKN1/3 : PKC (Protein Kinase C)-Related Kinase/Protein Kinase N 1/3

Pro (P) : Proline (acide aminé)

PtK2 : Potorous tridactylus Kidney 2

PyroP : Pyrophosphate

RE : Réticulum Endoplasmique

ROS : Reactive Oxygen Species

RPE1 : Retinal Pigment Epithelium

SDS : Dodécyl Sulfate de Sodium

Ser (S) : Sérine (acide aminé)

SxIP : Sérine/Thréonine-acide aminé quelconque-Isoleucine/Leucine-Proline (S/T-x-I/L-P ; Ser/Thr-x-Ile/Leu-Pro)

TE2X/4X : tampon échantillon 2X/4X

Thr (T) : Thréonine (acide aminé)

Trp (W) : Tryptophane (acide amine)

Tyr (Y) : Tyrosine (acide aminé)

V : volt

Val (V) : Valine

WB : Western Blot

WT : Wild Type (sauvage)

XMAP215 : Xenopus Microtubule-Associated Protein of 215 kDa

YFP : Yellow Fluorescent Protein (étiquette protéique fluorescente jaune)

Liste des figures et des tableaux

Liste des figures

Figure 1 : Organisation du réseau microtubulaire dans différents types cellulaires (Galjart, 2005).....	28
Figure 2 : Structure d'un microtubule et mise en évidence de ses sous-unités constitutives (Alberts, 2011).....	29
Figure 3 : Rôle du GTP dans la structure des microtubules ((Hashimoto, 2015 ; Brouhard and Rice, 2014)).....	31
Figure 4 : Structure tridimensionnelle d'un hétérodimère d' α/β -tubuline (numéro d'accèsion 1JFF dans la PDB) (Chakraborti et al., 2016).....	32
Figure 5 : Variations structurales du corps de la séquence C-terminale selon les isotypes de l' α - et la β -tubuline dans les cellules humaines (Chakraborti et al., 2016 ; Gadadhar et al., 2017).....	35
Figure 6 : Diverses mutations découvertes dans les hétérodimères d' α/β -tubulines (d'après Tischfield et al., 2011 ; Chakraborti et al., 2016).....	36
Figure 7 : Localisation des modifications post-traductionnelles des sous-unités α et β de la tubuline (Ikegami and Setou, 2010 ; Gadadhar et al., 2017).....	38
Figure 8 : Orientation des microtubules et localisation du ou des centre(s) organisateur(s) (MTOC) (A) dans un fibroblaste en interphase (d'après Alberts et al., 2011) (B-C) dans une cellule nerveuse et une cellule en mitose (d'après Hardin et al., 2012).....	42
Figure 9 : L'instabilité dynamique des microtubules analysée par simulation (d'après Coombes et al., 2013).....	42
Figure 10 : Schémas mettant en relief la notion de concentration critique d' α/β -tubuline libre nécessaire lors de l'auto-assemblage des MTs, en présence de centre de nucléation (centrosome) (d'après Hyman and Karsenti, 1998).....	43
Figure 11 : Phénomène de « <i>treadmilling</i> » ou « tapis roulant » des microtubules dû à la polymérisation à l'extrémité (+) et la dépolymérisation à l'extrémité (-) (Hardin et al., 2012).....	44
Figure 12 : Cycle de vie des microtubules <i>in vitro</i> (Hardin et al., 2012).....	45
Figure 13 : Impact d'un centre de nucléation sur la rapidité de polymérisation des microtubules, en passant plus vite la phase de nucléation, qui est observable pendant l'assemblage spontané des microtubules (Kollman et al., 2011 ; Roostalu and Surrey, 2017).....	45
Figure 14 : La nucléation centrosomale (d'après Alberts et al., 2011 ; Sulimenko et al., 2017).....	46
Figure 15 : La nucléation extra-centrosomale (d'après Teixidó-Travesa et al., 2012 ; Petry and Vale, 2015).....	47

Figure 16 : Reconstitution <i>in vitro</i> du comportement dynamique de l'extrémité (+) du microtubule (d'après Moriwaki and Goshima, 2016).....	49
Figure 17 : Importance de la tubuline GTP dans la dynamique des microtubules (d'après Dimitrov et al., 2008)	50
Figure 18 : Processus de vieillissement des MTs conduisant à un événement de catastrophe (Brouhard, 2015)	51
Figure 19 : Fonctions des microtubules pendant le neuro-développement (d'après Breuss et al., 2017).....	52
Figure 20 : Organisation et implication des microtubules dans l'architecture cellulaire (Bown-Anderson, 2015).....	53
Figure 21 : Polarité apico-basale (d'après Toya et al., 2016).....	54
Figure 22 : Complexes de la polarité apico-basale dans les cellules épithéliales (Chatterjee and McCaffrey, 2014)	54
Figure 23 : Polarité cellulaire (Gandalvočová et al., 2016 ; d'après Butler and Wallingford, 2017)	55
Figure 24 : Réseaux microtubulaires dans les cellules en migration et les neurones (d'après Li and Gundersen, 2008 ; De Forges et al., 2012 ; d'après Li and Gundersen, 2008).....	56
Figure 25 : Transport intracellulaire (d'après Alberts et al., 2011 ; Szul and Sztul, 2011)	57
Figure 26 : Rôle du cytosquelette d'actine et des microtubules dans le trafic des vésicules à cavéoline avec les protéines associées impliquées dans l'endocytose et le recyclage des cavéoles (Echarri and Del Pozo, 2015).....	58
Figure 27 : Rôle des microtubules dans le transport des vésicules d'endocytose et d'exocytose (Bonifacino and Neefjes, 2017)	59
Figure 28 : Implication des microtubules dans l'exocytose (Noordstra and Akhmanova, 2017).....	60
Figure 29 : Trafic intracellulaire assuré par les microtubules impliqué dans la dynamique des points d'adhésion (FAs) (Stehbens and Wittmann, 2012)	61
Figure 30 : Représentation du fuseau mitotique (Tolić, 2017).....	61
Figure 31 : Le kinétochore (d'après Weir et al., 2016 ; d'après Joglekar and Kukreja, 2017).....	62
Figure 32 : Transport (congression) et alignement des chromosomes pendant la prometaphase et la métaphase (Auckland and McAinsh, 2015).....	63
Figure 33 : Attachement des microtubules aux kinétochores (d'après Guo et al., 2013)	63
Figure 34 : Implication des microtubules et leurs protéines associées dans l'organisation intracellulaire des cellules en interphase et non polarisées (Alberts et al., 2011 ; d'après De Forges et al., 2012)	64
Figure 35 : Dans les neurones, le noyau est transporté le long des microtubules grâce à la dynéine (d'après Hu et al., 2013)	65

Figure 36 : Schéma d'une cellule nerveuse montrant le trafic vésiculaire le long des microtubules par les protéines motrices associées : la dynéine et la kinésine (d'après Alberts et al., 2011).....	66
Figure 37 : Implication des microtubules et des moteurs moléculaires dans le transport des particules virales de l'herpès dans les cellules humaines (d'après Dodding and Way, 2011)	67
Figure 38 : Rôle des microtubules dans l'autophagie induite après privation des cellules en nutriments (Geeraert et al., 2010).....	68
Figure 39 : Organisation des microtubules (A) dans des cellules épithéliales polarisées en interphase et en mitose, (B) ainsi que dans un fibroblaste en migration (Hernandez and Tirnauer, 2010).....	69
Figure 40 : Sites de fixation des agents antimitotiques sur les microtubules (d'après Calligaris et al., 2010; Jordan and Wilson, 2004 ; Jordan and Wilson, 2004)	70
Figure 41 : Dynamique des MTs diminuée en présence de paclitaxel (Dumontet and Jordan, 2010).....	71
Figure 42 : Structures primaires des agents anti-microtubulaires, (A) le monométhyl auristatin E, MMAE et (B) le monométhyl auristatin F, MMAF. Leurs structures peptidiques diffèrent au niveau du dernier acide aminé (Waight et al., 2016)	72
Figure 43 : Organisation des protéines associées aux microtubules (MAPs) (Alfaro-Aco and Petry, 2015 ; d'après Bowne-Anderson et al., 2015)	76
Figure 44 : Analyse phylogénétique et structure de MAPs structurales, stabilisatrices (Dehmelt and Halpain, 2005 ; d'après Mohan and John, 2015).....	77
Figure 45 : Structure de Tau et MAP2, lorsqu'elles lient et stabilisent les microtubules, qui permettent de faire des faisceaux de microtubules plus ou moins serrés (d'après Alberts et al., 2011).....	77
Figure 46 : Protéines paralogues humaines de la DCX, contenant tous deux domaines DC (N-DC en jaune et C-DC en orange) (Fourniol et al., 2013)	80
Figure 47 : Mise en évidence dans les microtubules, du site unique de liaison de la DCX (en jaune) entre les protofilaments (en bleu), grâce à la reconstitution à basse-résolution, de la structure en microscopie électronique (Fourniol et al., 2013)	81
Figure 48 : Structures des membres de la famille CAMSAP/Patronine/Nezha dans différents organismes (Akhmanova and Hoogenraad, 2015).....	81
Figure 49 : Dynamique <i>in vitro</i> de CAMSAP2 et EB1 au niveau des extrémités en croissance des MTs (d'après Akhmanova and Steinmetz, 2015)	82
Figure 50 : Structure des stathmines (Machado-Neto et al., 2014 ; Yip et al., 2014)	84
Figure 51 : Rôle de la stathmine dans la régulation de la dynamique des microtubules (Steinmetz, 2007 ; Rubin and Atweh, 2004)	85
Figure 52 : Activité catalytique des enzymes protéolytiques des microtubules (Bass, 2014 ; d'après Sharp and Ross, 2012 ; Bailey et al., 2016)	86
Figure 53 : Structure primaire et tertiaire de la spastine (Lumb et al., 2012 ; Sharp and Ross, 2012 ; Bailey et al., 2016)	87

Figure 54 : Localisation de certaines +TIPs au niveau des extrémités (+) des MTs en croissance (Akhmanova and Steinmetz, 2010 ; Akhmanova and Steinmetz, 2015).....	88
Figure 55 : Rôles des +TIPs dans la modulation de la dynamique des MTs (d'après Akhmanova and Steinmetz, 2010).....	89
Figure 56 : Interactions des +TIPs avec les MTs et diverses structures cellulaires dans différents organismes (d'après Akhmanova and Steinmetz, 2010 ; Akhmanova and Steinmetz, 2015)	90
Figure 57 : Structure des protéines EBs (Nehlig <i>et al.</i> , 2017 ; Mutstyatsa <i>et al.</i> , 2017).....	91
Figure 58 : Localisation des motifs LxxPPh trouvés dans Kar-9, dans SLAIN1, TACC1 (<i>Transforming Acidic Coiled-Coil</i>) et MACF1 (<i>Microtubule Actin Crosslinking Factor 1</i>) humaines et Dis1 de la levure (<i>S. pombe</i>) (d'après Kumar <i>et al.</i> , 2017).....	93
Figure 59 : Conservation des domaines TOG et riches en SK des protéines TOG/XMAP215 dans différents organismes (d'après Al-Bassam and Chang, 2011)	95
Figure 60 : Localisation et activité des protéines XMAP215 dans la dynamique des microtubules (d'après Al-Bassam and Chang, 2011)	97
Figure 61 : Conservation de la structure des CLASPs (Al-Bassam and Chang, 2011 ; d'après Mimori-Kiyosue <i>et al.</i> , 2005 ; Tsvetkov <i>et al.</i> , 2007).....	98
Figure 62 : Fonction de CLASP2 dans la capture des microtubules à la périphérie cellulaire (Schmidt <i>et al.</i> , 2012).....	100
Figure 63 : Localisation et activité des protéines CLASPs dans la dynamique des microtubules (d'après Al-Bassam and Chang, 2011 ; d'après Al-Bassam and Chang, 2010)	102
Figure 64 : Structure d'APC montrant l'organisation de ses domaines fonctionnels (Zhang and Shay, 2017).....	104
Figure 65 : Organisation du cytosquelette et des protéines de signalisation lors de la migration directionnelle d'une cellule épithéliale, d'une cellule neuronale (d'après Barth <i>et al.</i> , 2008).....	105
Figure 66 : Voie de signalisation induisant l'activation d'APC dans des cellules en migration (Bart <i>et al.</i> , 2008)	105
Figure 67 : Structure de la sous-unité de la dynactine de mammifère, p150 ^{Glued} (d'après Yan <i>et al.</i> , 2013).....	107
Figure 68 : Structure de CYLD (Yang and Zhou, 2016).....	108
Figure 69 : Structure de SLAIN1/2, MACF1 et STIM1 (d'après Akhmanova and Steinmetz, 2010 ; van der Vaart <i>et al.</i> , 2011).....	110
Figure 70 : Localisation des +TIPs (Akhmanova and Steinmetz, 2008).....	113
Figure 71 : Réseau d'interaction entre les +TIPs EB1, chTOG, CLIP-170, CLASP, p150 ^{Glued} , Dynéine et SLAIN2 (Akhmanova and Steinmetz, 2015).....	113

Figure 72: Mécanisme de localisation des +TIPs au niveau des extrémités (+) en croissance des microtubules (Galjart, 2005).....	114
Figure 73 : Structure de la dynéine cytosolique (d'après Akhmanova and Steinmetz, 2010 ; Robert et al., 2013 ; Dodding and Way, 2011)	116
Figure 74 : Régulateurs de la dynéine cytoplasmique (Jaarsma and Hoogenraad, 2015)	117
Figure 75 : Le complexe dynéine/dynactine (d'après Jha and Surrey, 2015 ; d'après Reck-Peterson, 2015 ; d'après Cianfrocco et al., 2015).....	119
Figure 76 : Structure et fonction de LIS1 (d'après Cianfrocco et al., 2015 ; d'après Tarricone et al., 2004).....	120
Figure 77 : Localisation de la dynéine au niveau des extrémités (+) des microtubules (d'après Cianfrocco et al., 2015).....	121
Figure 78 : Structure de Ndel1/Nde1 (d'après Vallee et al., 2012).....	121
Figure 79 : Arbre phylogénétique des quarante-cinq gènes de kinésines chez la souris, regroupés en quinze familles (Miki et al., 2001 ; Hirokawa et al., 2009)	122
Figure 80 : Structure secondaire et tertiaire de certaines kinésines humaines (d'après Hirokawa et al., 2009 ; Dodding and Way, 2011)	123
Figure 81 : Régulation de la dynamique des MTs par certaines kinésines (Sturgill and Ohi, 2013)	126
Figure 82 : Structure et activité de MCAK (d'après Hardin et al., 2012 ; d'après Akhmanova and Steinmetz, 2010).....	127
Figure 83 : Modèle simplifié des rôles de différentes kinésines mitotiques pendant la mitose (Rath and Kozielski, 2012)	128
Figure 84 : Structure et rôle dans la division cellulaire des kinésine Eg5 et KIFC1 (d'après Alberts et al., 2011 ; Valentine et al., 2006 ; d'après She and Yang, 2017).....	129
Figure 85 : Rôle de la kinésine CENP-E (kinésine-7) lors de la division cellulaire (d'après Sardar et al., 2010)	129
Figure 86 : Changements conformationnels de la kinésine-1 (d'après Cai et al., 2007)	131
Figure 87 : Transport de cargaisons par la kinésine conventionnelle, aidé des protéines d'échafaudages, JIPs (en rouge) (d'après Verhey et al., 2001)	133
Figure 88 : Phosphorylation de +TIPs par GSK3 β (Tamura and Draviam, 2012).....	137
Figure 89 : Isoformes de CLIP-170 (d'après Griparic and Keller, 1998 ; d'après Griparic et al., 1998).....	139
Figure 90: Structure des isoformes et homologues de CLIP-170 dans différentes espèces ainsi que la structure de son paralogue humain, CLIP-115 (aa : acides aminés ; Ct : C-terminal ; Nt : N-terminal) (d'après Griparic and Keller, 1998 ; Lantz and Miller, 1998 ; Brunner and Nurse, 2000 ; Efimov et al., 2006 ; Akhmanova and Steinmetz, 2008 ; Weng et al., 2013)	140

Figure 91 : Structure de CLIP-170 (d'après Pierre et al., 1994 ; Bieling et al., 2008 ; Gupta et al., 2010 ; d'après Scheel et al., 1999).....	140
Figure 92 : Interactions protéines médiées par les domaines structuraux de CLIP-170 (d'après Gouveia and Akhmanova, 2010)	142
Figure 93 : Repliement intramoléculaire de CLIP-170 conduisant à son inactivation (d'après Lansbergen et al., 2004)	142
Figure 94 : Régulation du repliement intramoléculaire de CLIP-170 par phosphorylation (d'après Lee et al., 2010 ; Nirschl et al., 2016 ; d'après Lee et al., 2010 ; Nakano et al., 2010 ; Kakeno et al., 2014).....	144
Figure 95 : Modifications post-traductionnelles de CLIP-170 (d'après Choi et al., 2002 ; Yang et al., 2009 ; Li et al., 2010 ; Lee et al., 2010 ; Nakano et al., 2010 ; Hsu et al., 2011 ; Collazos et al., 2011 ; Kakeno et al., 2014 ; Amin et al., 2014 ; Kedashiro et al., 2015 ; Nirschl et al., 2016 ; d'après Li et al., 2014 ; d'après Martín-García and Mulvihill, 2009 ; d'après Alonso et al., 2012).	148
Figure 96 : Localisation de CLIP-170 dans les cellules humaines en interphase (RPE1) (d'après de Forges et al., 2016).....	149
Figure 97 : Localisation de CLIP-170 dans les cellules HeLa (d'après Pierre et al., 1994)	150
Figure 98 : Mécanismes potentiels permettant à CLIP-170 de se fixer et de suivre les extrémités (+) des microtubules dynamiques (Folker et al., 2005).....	151
Figure 99 : Domaines structuraux de CLIP-170 à l'origine des interactions avec ses partenaires au sein du réseau de +TIPs (d'après Akhmanova and Steinmetz, 2008)	152
Figure 100 : Co-polymérisation de CLIP-170 (H2) avec la tubuline (d'après Arnal et al., 2004).....	154
Figure 101 : Régulation de la dynamique des microtubules par le facteur de sauvetage CLIP-170 (d'après Komarova et al., 2002a)	156
Figure 102 : Localisation de CLIP-170 et les récepteurs à la transferrine sur les vésicules d'endocytose dans les cellules HeLa (d'après Pierre et al., 1992).....	157
Figure 103 : Association de CLIP-170 avec le complexe dynéine/dynactine via p150 ^{Glued} et LIS1, afin de médier le transport des vésicules vers l'extrémité (-) des microtubules (d'après Wittman and Desai, 2005 ; d'après Duellberg et al., 2014 ; d'après Moughamian et al., 2013).....	158
Figure 104 : Rôle de CLIP-170 dans le transport d'HSV1 (d'après Jovasevic et al., 2015)	160
Figure 105 : Rôle des CLIPs dans la capture et le transport de vésicules (d'après Nirsch et al., 2016).....	160
Figure 106 : Rôle de CLIP-170 dans les mélanocytes de xénope en interphase (Lomakin et al., 2009)	162
Figure 107 : Implication de CLIP-170 dans la séparation des centrosomes (Tanenbaum et al., 2008)	163
Figure 108 : Dans des cellules HeLa mitotiques, CLIP-170 participe à l'alignement des chromosomes en assurant l'attachement des MTs avec les kinétochores (d'après Kakeno et al., 2014).....	164

Figure 109 : Rôle de CLIP-170 dans l'alignement des chromosomes (d'après Amin et al., 2015 ; d'après Amin et al., 2014)	165
Figure 110 : Fonction de CLIP-170 dans les jonctions cellulaires composées d'E-cadhérine (d'après Stehbens et al., 2006)	166
Figure 111 : Rôle de CLIP-170 dans la phagocytose (d'après Lewkowicz et al., 2008).....	167
Figure 112 : Implication de CLIP-170 dans l'assemblage des filaments d'actine en interagissant avec mDia1/formin, dans les neurones (Henty-Ridilla et al., 2016)	167
Figure 113 : Rôle de CLIP-170 dans le recrutement de la nineine corticale dans des cellules MDCKII (d'après Goldspink et al., 2017).....	168
Figure 114 : Rôle de CLIP-170 dans la cancérogénèse (d'après Sun et al., 2013 ; d'après Xie et al., 2014).....	170
Figure 115 : Mécanisme proposé pour l'action du Brentuximab Vedotin dans les cellules Reed-Sternberg dans le lymphome de Hodgkin (Currin and Gopal, 2012).....	171
Figure 116 : Représentation de la <i>Williams Syndrome Critical Region</i> (WSCR) (Hoogenraad et al., 2004 ; d'après Vandeweyer et al., 2012)	172
Figure 117 : Voie de signalisation des MAPKs (d'après Cargnello and Roux, 2011 ; Kim and Choi, 2015 ; Khorasanizadeh et al., 2017).....	174
Figure 118 : Représentation de la structure générale des MAPKs conventionnelles (d'après Cargnello and Roux, 2011).....	175
Figure 119 : Mécanisme général d'activation des ERKs, via un récepteur tyrosine kinase : la voie Ras/Raf/MEK/ERK (d'après Khorasanizadeh et al., 2017).....	176
Figure 120 : Mécanisme d'activation de la voie des MAPKs p38 (d'après Cuadrado and Nebreda, 2010).....	181
Figure 121 : Organisation générale de la voie d'activation des JNKs (Zeke et al., 2016).....	184
Figure 122 : Mécanisme général de la voie d'activation des JNKs (d'après Hotamisligil and Davis, 2016 ; Zeke et al., 2016 ; Khorasanizadeh et al., 2017)	185
Figure 123 : Structure de JIP1 (Zeke et al., 2016).....	187
Figure 124 : Recrutement de la voie des JNKs le long des microtubules via une protéine adaptatrice des JNKs, JIP1 et la kinésine-1 dans les neurones (d'après Zeke et al., 2016)	187
Figure 125 : L'épissage alternatif des trois gènes humains codant pour les JNKs (d'après Coffey, 2014 ; Zeke et al., 2016)	189
Figure 126 : Mécanisme de l'activation constitutive des JNKs, exemple de JNK2 α 2 (d'après Nitta et al., 2008)	190
Figure 127 : Caractéristiques structurales des JNKs (d'après Zeke et al., 2016).....	191

Figure 128 : Les deux classes principales de séquences peptidiques de <i>docking</i> dans les substrats des JNKs, interagissant avec les motifs D des kinases (d'après Zeke et al., 2016)	193
Figure 129 : Interaction entre les substrats et les JNKs via le motif D de la kinase (d'après Zeke et al., 2016).....	193
Figure 130 : Rôles de JNK lors de la prolifération et la survie au cours du cycle cellulaire (d'après Lee and Song, 2008 ; Gutierrez et al., 2010 ; Zhang et al., 2015).....	198
Figure 131 : Modèle général d'action de JNK dans les cellules en réponse au stress (Solinas and Becattini, 2016)	198
Figure 132 : Les JNKs sont impliquées dans le cancer via leurs activités cellulaires (d'après Bubici and Papa, 2014)	200
Figure 133 : Mécanismes cellulaires régulés par JNK dans la maladie d'Alzheimer (d'après Yarza et al., 2016)	201
Figure 134 : Effets métaboliques de l'activation de JNK au cours du développement de l'obésité (d'après Pal et al., 2016).....	202
Figure 135 : Cible pharmacologique de certains inhibiteurs des JNKs (ATPc : inhibiteurs compétitifs de l'ATP ; MLKi : <i>Mixed Linage Kinase inhibitors</i>) (Yarza et al., 2016).....	203
Figure 136 : Implication de JNK1 dans la stabilité des microtubules via ses MAPs substrats (d'après Marchisella et al., 2016)	204
Figure 137 : Contrôle et organisation de la dynamique des microtubules par la voie Kinesine-1/JIP/JNK (d'après Daire and Poüs, 2011).....	207
Figure 138 : La voie de signalisation Kinesine-1/JIP/JNK (d'après Daire and Poüs, 2011).....	208
Figure 139 : Régulation de la dynamique des MTs par la voie kinésine-1/JIP1/JNK dans les cellules épithéliales vivantes (d'après Daire et al., 2009).....	209
Figure 140 : Modulation de l'activité de JNK (d'après Daire et al., 2009 ; Zeke et al., 2016 ; d'après Hildesheim et al., 2002 ; Zeke et al., 2016 ; Khorasanizadeh et al., 2017).....	216
Figure 141 : Schéma des cycles de la PCR (d'après Agilent.com)	221
Figure 142 : Principe général de la méthode de mutagenèse dirigée (QuickChange® Lightning Site-directed, Agilent technologies), résumant les trois grandes étapes de la technique : PCR (permettant d'incorporer la mutation dans l'ADN plasmidique), digestion par <i>DpnI</i> et transformation bactérienne (d'après Agilent.com).....	224
Figure 143 : Réalisation des extraits microtubulaires : extraction du cytosol et des microtubules totaux.....	225
Figure 144 : Principe général de l'immunoprécipitation et de la co-immunoprécipitation (d'après ThermoFisher.com).....	227
Figure 145 : Schéma montrant l'action du Phos-tag TM (Wako, NARD Institute, Ltd.) dans un gel SDS-PAGE au cours de la migration (d'après Kinoshita et al., 2006 ; Kinoshita et al., 2009).....	234

Figure 146 : Étude de la phosphorylation de CLIP-170 endogène.....	250
Figure 147 : Observation de l'impact de l'activité de JNK1 α 1 sur la phosphorylation du domaine H1 de CLIP-170 dans le système reconstitué <i>in vitro</i>	251
Figure 148 : Détermination de l'impact de l'état de la tubuline (monomère, dimère ou polymère) lors de la phosphorylation <i>in vitro</i> de CLIP-170 par JNK1 α 1 (GST-JNK1α1 plus ou moins active).....	253
Figure 149 : Recouvrement de séquence de la protéine GFP-H1 ^{WT} en spectrométrie de masse (A) dans l'échantillon SP600125 (61 %) et (B) dans l'échantillon Flag-MKK7-JNK1 α 1 ^{WT} (58 %)	254
Figure 150 : Contrôle de l'activation des JNKs endogènes par des stress courts et l'expression des transgènes de Flag-MKK7-JNK après 24h de transfection.....	257
Figure 151 : Effet de l'activité de JNK sur la localisation de CLIP-170 endogène au niveau des croisements microtubulaires dans les cellules HeLa.....	258
Figure 152 : Analyse de la fragmentation des comètes CLIP-170	259
Figure 153 : Régulation positive de la dynamique des microtubules par la voie JNK/CLIP-170 dans les cellules épithéliales en interphase.....	262
Figure 154 : Alignement des séquences peptidiques des différentes isoformes de la β -tubuline.....	269
Figure 155 : Étude de la phosphorylation de la β -tubuline endogène par JNK.....	270
Figure 156 : Analyse de la phosphorylation de la β -tubuline endogène par JNK dans des extraits cytosoliques et microtubulaires de cellules HeLa.	271
Figure 157 : Observation de la phosphorylation de la β -tubuline endogène régulée par JNK.....	272
Figure 158 : Analyse de la phosphorylation de la β -tubuline sur des résidus thréonine dans les cellules HeLa.....	274
Figure 159 : Phosphorylation <i>in vitro</i> de la tubuline par JNK.....	275
Figure 160 : Étude de la phosphorylation des dimères α/β -tubuline par JNK sur des résidus thréonine dans un système reconstitué <i>in vitro</i>	276
Figure 161 : Étude de la phosphorylation des dimères α/β -tubuline par JNK sur des résidus sérine dans un système reconstitué <i>in vitro</i>	277
Figure 162 : Observation de la phosphorylation des dimères α/β -tubuline par JNK dans un système reconstitué <i>in vitro</i>	277
Figure 163 : Détermination du/des site(s) de phosphorylation par JNK dans la β -tubuline	278
Figure 164 : Contrôle de l'immunoprécipitation des transgènes.....	279
Figure 165 : Étude de l'interaction entre JNK et la β -tubuline	280
Figure 166 : Analyse de l'effet de la phosphorylation de la β -tubuline sur la Thr219 au niveau de l'organisation générale du réseau microtubulaire.....	282

Figure 167 : Structure de la tubuline (deux dimères liés à la protéine Rb3, structure 3N2K).....	283
Figure 168 : Détermination du comportement dynamique des microtubules en fonction de l'état de phosphorylation de la β -tubuline.....	284
Figure 169 : Détermination du comportement dynamique des microtubules en fonction de l'état de phosphorylation de la β -tubuline.....	285
Figure 170 : Protéines ayant un ou plusieurs domaine(s) CAP-Gly et leurs propriétés (d'après Steinmetz and Akhmanova, 2008)	292

Liste des tableaux

Tableau 1 : Isotypes des sous-unités α et β de la tubuline chez l'homme (d'après Parker et al., 2014 ; d'après NCBI Gene , https://www.ncbi.nlm.nih.gov/gene/).....	34
Tableau 2 : Modifications post-traductionnelles (MPTs) connues des sous unités α et β de la tubuline (d'après Wloga and Gaertig, 2010 ; Yu et al., 2015 ; Gadadhar et al., 2017)	37
Tableau 3 : Sites de phosphorylation identifiés dans les sous-unités α et β de la tubuline sur de la tubuline isolée de cellules HeLa (d'après Liu et al., 2015)	40
Tableau 4 : Regroupement des nouvelles +TIPs identifiées en recherchant des interactants des protéines EBs.....	112
Tableau 5 : Regroupement des protéines adaptatrices du complexe dynéine/dynactine assurant une spécificité de substrat au complexe moteur (d'après Maday et al., 2014 ; Fu and Holzbaaur, 2014)	118
Tableau 6 : Principaux rôles des membres des familles de kinésines (d'après Miki et al., 2005 ; Rath and Kozielski, 2012 ; Sturgill and Ohi, 2013 ; Cross and McAinsh, 2014 ; Vicente and Wordeman, 2015 ; Drechsler and McAinsh, 2016 ; She and Yang, 2017).....	124
Tableau 7 : Regroupement des protéines d'échafaudages de la kinésine-1, avec leurs régulateurs, induisant une spécificité envers leurs cargaisons à transporter (d'après Hirokawa and Noda, 2008 ; Fu and Holzbaaur, 2014)	132
Tableau 8 : Exemples de Kinases phosphorylant des MAPs stabilisatrices et effets de ses phosphorylations sur les microtubules (d'après Ramkumar et al., 2017)	134
Tableau 9 : Exemples de kinases phosphorylant des moteurs moléculaires et leurs protéines associées, ainsi que des +TIPs (d'après Tamura and Draviam, 2012).....	136
Tableau 10 : Classification et nomenclature des MAPK (d'après Cargnello and Roux, 2011 ; Coffey, 2014, Zeke et al., 2016)	173
Tableau 11 : Substrats des ERKs associés au cytosquelette des microtubules (d'après Yoon and Seger, 2006 ; Tamura and Draviam, 2012 ; Xue et al., 2014).....	177
Tableau 12 : Regroupement des protéines homologues à JNK avec leurs gènes chez la drosophile (<i>D. melanogaster</i>), le nématode (<i>C. elegans</i>) et la levure de bière (<i>S. cerevisiae</i>).....	192

Tableau 13 : Rassemblement des différents substrats (23) identifiés des JNKs dans dix groupes protéiques en fonction de leur caractéristiques et identification du type de séquence de liaison au motif de <i>docking</i> (D) de JNK : A (site <i>JIP1-like</i>), B (site <i>NFAT-like</i>), C et D (site atypique et non caractérisé) (d'après Zeke et al., 2016	195
Tableau 14 : Les MAPs neuronales substrats des JNKs (d'après Zeke et al., 2016 ; Marchisella et al., 2016).....	196
Tableau 15 : Principales fonctions physiologiques des JNKs (d'après Bode and Dong, 2007 ; Weston and Davis, 2007 ; Kumar et al., 2015 ; Kim and Choi, 2015 ; Zeke et al., 2016 ; Hotamisligil and Davis, 2016).....	197
Tableau 16 : La voie de signalisation des JNKs est impliquée dans de multiple maladies en fonction des rôles physiologiques des JNKs (d'après Bode and Dong, 2007 ; Weston and Davis, 2007 ; Sabapathy, 2012 ; Kim and Choi, 2015 ; Kumar et al., 2015 ; Zeke et al., 2016 ; Hotamisligil and Davis, 2016).....	199
Tableau 17 : Composition du milieu complet utilisé en culture cellulaire	212
Tableau 18 : ADN plasmidiques utilisés lors des transfections cellulaires transitoires. Les quantités indiquées correspondent à ce qui est utilisé pour un puits de plaque 6 puits	214
Tableau 19 : Composition des solutions utilisées en immunofluorescence	218
Tableau 20 : Anticorps primaires et secondaires utilisés en immunofluorescence	218
Tableau 21 : Séquence des oligonucléotides utilisés en mutagénèse dirigée.....	223
Tableau 22 : Composition des milieux NZY ⁺ , LB et LB-agar utilisés en bactériologie	224
Tableau 23 : Composition des solutions (PBS, TE2X et TE4X) utilisées lors de la lyse cellulaire.....	225
Tableau 24 : Composition des tampons utilisés lors de l'extraction du cytosol et des microtubules totaux.....	226
Tableau 25 : Tampons utilisées en (co-)immunoprécipitation par GFP-trap et pour la phosphorylation <i>in vitro</i>	229
Tableau 26 : Solutions utilisées dans les expériences de radioactivité pour observer la phosphorylation <i>in vitro</i> de la β -tubuline par JNK.....	231
Tableau 27 : Masse moléculaire théorique des différentes protéines étudiées et/ou utilisées lors de l'étude, ainsi que la composition des gels SDS-PAGE d'acrylamide	232
Tableau 28 : Composition des tampons utilisés en Western-blot.....	234
Tableau 29 : Anticorps primaires et secondaires avec les dilutions auxquelles ils sont utilisés en Western-blot.....	236
Tableau 30 : Bilan des sites de phosphorylation détectés par analyse nano-LC-MS/MS Triple TOF (analyse menée à la plateforme SICapS, IBBC, Gif sur Yvette).....	255
Tableau 31 : Fragmentation des comètes CLIP-170	260

Tableau 32 : Nombre de sites consensus de phosphorylation pour JNK (SP/TP) dans le domaine H1 de CLIP-170 chez différentes espèces.....	263
Tableau 33 : Effets des facteurs des CLASPs et CLIPs dans le sauvetage des microtubule (S : <i>Shortening</i> , G : <i>Growth</i> , P : <i>Pause</i>) (d'après Komarova et al., 2002a ; Mimori-Kiyosue et al., 2005)	265
Tableau 34 : MAPs envisageables comme des nouveaux substrats de JNK ayant des effets sur la dynamique des microtubules, du fait de la présence de sites SP/TP consensus	291

Liste des annexes

Annexe I : Tableau regroupant les partenaires protéiques de CLIP-170, son paralogue CLIP-115 et ses homologues (D-CLIP-190, Bik1 et Tip1). La majorité des partenaires sont des +TIPs (d'après Akhmanova and Hoogenraad, 2005 ; Galjart, 2010).....	I
Annexe II : Alignement des séquences peptidiques des trois isoformes humaines de CLIP-170	III
Annexe III : Alignement des séquences peptidiques du domaine H1 entre CLIP-170 (P30622) et CLIP-115 (Q9UDT6).....	IV
Annexe IV : Alignement des séquences peptidiques de la partie N-terminale de CLIP-170 dans différentes espèces.....	V
Annexe V : Séquence peptidique de la β -tubulineIVb humaine (NP_006079).....	VI
Annexe VI : Crible systématique pour identifier d'autres substrats de JNK dans les cellules épithéliales impliqués dans la dynamique des microtubules.....	VII

Sommaire

Liste des abréviations	3
Liste des tableaux et figures	7
Sommaire	19
Avant-propos et objectifs	25
Introduction générale.....	27
Première partie : les microtubules	27
I - Structure et composition des microtubules.....	28
A – Découverte des microtubules.....	28
B – Structure des microtubules	29
C – Composition des microtubules : la tubuline	31
C1 – Les domaines fonctionnels des sous-unités α et β de la tubuline	32
D – Hétérogénéité des sous-unités α et β de la tubuline	33
D1 – Les isotypes de l' α - et la β -tubuline.....	33
D2 – Les mutations dans les isotypes des sous-unités α et β de la tubuline	35
D3 – Les modifications post-traductionnelles (MPTs) des sous-unités α et β -tubuline	37
D3a – Les phosphorylations des tubulines	39
D3b - Interactions moléculaires contrôlées par les modifications post-traductionnelles	40
II – Propriétés fondamentales des microtubules.....	41
A – La polarisation des microtubules.....	41
B – La dynamique des microtubules et sa régulation.....	42
B1 – Concentration critique, phénomène de « <i>treadmilling</i> », cycle de vie, et nucléation des microtubules	43
B2 – Instabilité dynamique.....	48
III – Fonctions des microtubules	51
A – Polarité et migration cellulaire	53
B – Trafic/transport intracellulaire	57
B1 – Transport des vésicules, organites d'endocytose et d'exocytose.....	58
B2 – Transport des chromosomes pendant la mitose	61
B3 – Transport des organites cellulaires	64
B4 – Transport axonal	66
B5 – Transport des virus	66
B6 – Voies de signalisation	67
IV - Les microtubules comme cible thérapeutique.....	69
A – Les taxanes et vinca-alcaloïdes.....	70
B – Effets secondaires et résistance aux agents antimitotiques ciblant les microtubules.....	73
Deuxième partie : les protéines associées aux microtubules et leurs fonctions	75
I – Régulation de la dynamique des microtubules par les protéines associées aux microtubules (MAPs)	75
A – Les MAPs structurales stabilisatrices	76
A1 – La protéine Tau.....	76
A2 – Les protéines MAP2 et MAP4.....	78
A3 – Les protéines MAP1	79
A4 – La Doublecortin (DCX).....	79
A5 – Les protéines +TIP CAMSAP/Patronine/Nezha	81
B – Les MAPs déstabilisatrices.....	83

B1 – Les kinésines dépolymérisantes.....	83
B2 – Les stathmines	83
B3 – Les enzymes protéolytiques des MTs.....	85
II – Régulation de la dynamique des microtubules par les protéines +TIPs (<i>plus-end Tracking Proteins</i>).....	87
A – La famille des protéines EBs.....	90
A1 – Structure des protéines EBs.....	91
A2 – EB et le réseau de +TIPs	92
A2a – Les motifs SxIP.....	92
A2b – Les domaines CAP-Gly.....	92
A2c – Les motifs LxxPTPh.....	93
A3 – Fonctions des protéines EBs dans la dynamique des microtubules.....	93
A4 – Localisation subcellulaires des protéines EBs.....	94
B – Les protéines TOG (<i>Tumor Overexpressed Gene</i>)/XMAP215.....	95
B1 – Structure des protéines TOG.....	95
B2 – Localisation et fonctions des protéines TOG.....	96
C – Les protéines CLASPs.....	98
C1 – Structure des CLASPs	99
C2 – Partenaires et fonctions des CLASPs.....	99
D – Les protéines APC.....	103
D1 – Structure de la protéine APC.....	103
D2 – Fonctions d’APC dans l’environnement microtubulaire.....	104
E - Les protéines à domaine CAP-Gly	106
E1 – Les protéines CLIPs.....	106
E2 – La sous-unité de la dynactine, p150 ^{Glued}	106
E3 – La désubiquitineuse CYLD.....	108
F – Les protéines motrices.....	109
G – Les autres protéines +TIPs	110
H – Les mécanismes de localisation des +TIPs.....	112
III – Les protéines MAPs motrices et le transport des cargaisons.....	115
A – Les dynéines	115
A1 – Structure de la dynéine	115
A2 – Régulateurs majeurs du recrutement des cargaisons et de l’activité motrice de la dynéine cytoplasmique.....	116
A2a – Le complexe macromoléculaire dynéine/dynactine.....	118
A2b – LIS1	119
A2c – Ndel1/Nde1.....	121
B – Les kinésines.....	121
B1 – Structure des kinésines et en particulier de la kinésine-1	123
B2 – Fonctions des kinésines	124
B2a – Implication des kinésines dans la dynamique des microtubules.....	125
B2b – Implication des kinésines dans la division cellulaire.....	128
B3 – Régulation de l’activité de la kinésine-1.....	130
B4 – Interactions des kinésines avec leurs cargaisons	131
IV – Régulation de l’activité des MAPs	133
A – Contrôle des interactions moléculaires des MAPs via les modifications post-traductionnelles de la tubuline.....	133
B – Régulation de l’activité des MAPs par phosphorylation	134
V – La famille des CLIPs et son membre fondateur CLIP-170	138
A – Les membres de la famille des CLIPs	138
B – Structure de CLIP-170.....	140
B1 – Auto-inhibition de CLIP-170 par repliement moléculaire.....	142

C – Structure de CLIP-115 et des homologues de CLIP-170.....	144
D – Modifications post-traductionnelles de CLIP-170.....	146
E – Localisation de CLIP-170 aux microtubules	149
E1 – CLIP-170 : première +TIP identifiée	150
F – Fonctions des CLIPs	155
F1 –CLIP-170 est un facteur de sauvetage des microtubules.....	155
F2 – Les CLIPs assurent la capture et le transport de diverses cargaisons/organites	157
F3 – Implication des CLIPs dans des maladies	169
Troisième partie : la famille des Mitogen-Activated Protein Kinases (MAPKs).....	173
I – La voie des Mitogen-Activated Protein Kinases (MAPKs).....	173
A – La voie de signalisation cellulaire incluant les ERKs	175
A1 – Découverte des kinases ERKs	175
A2 – Les protéines ERK1 et ERK2.....	176
A3 - Substrats des ERKs	177
A4 – Fonctions des ERKs	178
A5 – Implication de la voie de signalisation des ERKs dans des maladies.....	178
A6 – Inhibiteurs des ERKs.....	179
B – La voie de signalisation cellulaire des MAPKs p38	179
B1 – Découverte des kinases p38.....	179
B2 – Les isoformes de p38.....	180
B3 – Mécanismes d’activation de p38.....	180
B4 – Substrats de p38.....	181
B5 – Fonctions de p38.....	182
B6 – Implication de la voie de p38 en pathologie	182
B7 – Inhibiteurs de la kinase p38	183
II – La voie de signalisation des JNKs	183
A – Découverte des JNKs	183
B – Les voies de signalisation des JNKs	183
B1 – Activation de la voie de signalisation des JNKs	183
B2 – Inhibition des JNKs	186
B3 – Les protéines d’échafaudage des JNKs	186
C – Les isoformes des JNKs.....	188
D – Structure des JNKs	190
E – Les homologues des JNKs	192
F – Substrats des JNKs.....	192
F1 – Quelques exemple de substrats	196
F2 – Substrats des JNKs associés aux microtubules	196
G - Fonctions physiologiques des JNKs.....	196
G1 – Quelques exemples de fonctions physiologiques des JNKs	197
H – Implications des JNKs dans des maladies humaines.....	199
H1 – Quelques exemple de fonctions pathologiques des JNKs	200
I – JNK comme cible pharmacologique potentielle : comment inhiber JNK.....	203
J – Implication de JNK dans la dynamique des microtubules via ses MAPs neuronales substrats.....	204
III – Implication de JNK dans la dynamique des microtubules dans les cellules épithéliales	207
A – Localisation aux microtubules : implication du complexe kinésine-1/JIP1	207
B – Impact de JNK sur la dynamique des microtubules.....	208
Matériel et méthodes	211
Partie I : Culture cellulaire	211
I – Cellules employées	211

A – Cellules HeLa	211
B – Cellules PtK2 (NBL-5)	211
C – Cellules RPE-1	211
II – Conditions de culture	212
A – Le repiquage des cellules	212
B – Congélation et décongélation	212
III - Transfection transitoire des lignées cellulaires	213
A – Transfection transitoire au Turbofect	214
B – Transfection transitoire au JetPEI®	214
C – Transfection transitoire au Fugene	215
IV – Traitement cellulaire	215
Partie II : Microscopie à fluorescence	217
I – Immunofluorescence	217
A – Fixation au méthanol	217
B – Fixation au paraformaldéhyde (PFA)	217
C – Fixation méthanol-EGTA/PFA	217
D – L’immunomarquage	218
E – Montage des lames et observation au microscope à fluorescence	219
II – Imagerie en temps réel	219
Partie III : Biologie moléculaire et biochimie	220
I – Mutagenèse dirigée	220
II – Lyse cellulaire	225
A – Extraits protéiques totaux	225
B – Extraits microtubulaires	225
III – Immunoprécipitation (co-immunoprécipitation) par GFP-trap	227
IV – Phosphorylation <i>in vitro</i> à partir des protéines d’intérêts immunoprécipitées par GFP-trap	229
V – Phosphorylation <i>in vitro</i> de la tubuline	230
VI – Dosage des protéines	232
VII – Electrophorèse SDS-PAGE et Western Blot révélé par chimioluminescence	232
Résultats et discussions	237
Première partie : CLIP-170, un nouveau substrat de JNK dans les cellules épithéliales	239
I – CLIP-170 est une phosphoprotéine cible de JNK en condition de stress	239
A – Phosphorylation de CLIP-170 basale et médiée par un stress court activant JNK dans les cellules HeLa	240
B – Phosphorylation d’un troisième site consensus de phosphorylation lorsque JNK subit une activation longue dans les cellules HeLa	241
C – Phosphorylation <i>in vitro</i> de CLIP-170 par JNK	242
II – L’activité de sauvetage de CLIP-170 est stimulée par JNK	243
A – Conservation de la phosphorylation du domaine H1 dans les cellules PtK2	244
B – Impact de la phosphorylation de CLIP-170 sur la dynamique des microtubules	244
C – Impact de la phosphorylation de CLIP-170 par JNK sur les fréquences de sauvetage	245

III – La localisation de CLIP-170 aux microtubules n’est pas régulée par JNK.....	245
Article : c-Jun N-terminal kinase-dependent phosphorylation of CLIP-170 promotes microtubule rescues	247
Résultats complémentaires concernant CLIP-170.....	249
I – Phosphorylation de CLIP-170 endogène	250
II – Phosphorylation <i>in vitro</i> du domaine H1 de CLIP-170 par JNK.....	251
A – Impact de l’activité de JNK sur la phosphorylation du domaine H1 de CLIP-170 <i>in vitro</i>	251
B – Impact de l’état de la tubuline (monomère, dimère ou polymère) lors des essais de phosphorylation <i>in vitro</i>	252
III – Identification des sites de phosphorylation de JNK par spectrométrie de masse	254
IV – Niveau d’activation de la JNK endogène en fonction des stress.....	256
V – Localisation de CLIP-170 et état du réseau de microtubules en fonction de la phosphorylation.....	258
Discussions et perspectives concernant CLIP-170.....	261
Deuxième partie : La β -tubuline comme nouveau substrat potentiel de JNK ?	269
I – Etude de la phosphorylation de la β -tubuline médiée par JNK dans les cellules HeLa.....	270
A – Analyse de la phosphorylation de la β -tubuline endogène dans les cellules HeLa	270
B – Phosphorylation de la β -tubuline endogène dans des extraits microtubulaires de cellules HeLa.....	271
C – Étude de la phosphorylation de la β -tubuline surexprimée dans des cellules Hela et immunoprécipitée par GFP-trap.....	273
II – Analyse de la phosphorylation <i>in vitro</i> de la β -tubuline par JNK	275
A – Étude de la phosphorylation <i>in vitro</i> de la tubuline et détermination du/des site(s) de phosphorylation.....	275
B - Caractérisation du site identifié comme phosphorylé <i>in vitro</i> par JNK.....	278
III – Etude de l’interaction de la β -tubuline avec JNK.....	279
IV – Effet de la phosphorylation médiée par JNK sur la localisation cellulaire de la β -tubuline	281
V – Effet de la phosphorylation de la β -tubuline médiée par JNK sur la dynamique des MTs	283
Discussion et perspectives pour la β -tubuline	287
Conclusion générale et perspective	289
Bibliographie	293
Annexes	I

Avant-propos et objectifs

De nombreux progrès ont été réalisés aussi bien au niveau de la prévention que du traitement des cancers. Parmi ces traitements, beaucoup d'agents agissant sur la dynamique des microtubules (MTs) sont utilisés en clinique, mais les mécanismes d'action de ces agents ne sont pas encore complètement élucidés et dans de nombreux cas, les cellules cancéreuses présentent des résistances thérapeutiques intrinsèques ou acquises. Il est donc primordial de comprendre comment fonctionne la dynamique des MTs pour apprécier ses fonctions physiologiques et son évolution en situation de stress, aussi bien en interphase qu'en mitose. Mieux appréhender les mécanismes de régulation de la dynamique des MTs est donc indispensable pour savoir pourquoi les résistances existent et comment elles apparaissent en situation de stress. Cette thèse s'inscrit dans cette démarche en explorant certains aspects de régulation de la dynamique des MTs en réponse à la protéine kinase de stress JNK.

Les microtubules (MTs) font partie du squelette d'une cellule. Ce dernier correspond à un ensemble organisé de polymères biologiques, qui lui confère l'essentiel de ses propriétés mécaniques et des propriétés permettant l'organisation dynamique du contenu cellulaire. En plus des microtubules, deux autres types de filaments sont retrouvés au sein du cytosquelette : les filaments d'actine et les filaments intermédiaires. Chaque composant va jouer un rôle particulier en assurant des propriétés mécaniques et biologiques différentes. Ces trois réseaux sont coordonnés et interdépendants.

Concernant les MTs, dans les cellules en interphase, ils permettent la localisation subcellulaire d'organites, ainsi que le transport des protéines, vésicules membranaires ou chromosomes sur de longues distances par l'intermédiaire de protéines motrices associées, telles que les kinésines et la dynéine. Les MTs sont très impliqués dans les phénomènes de migration, de division cellulaire et dans l'organisation de nombreuses voies de signalisation. Ils présentent un caractère hautement dynamique, alternant entre des phases de dépolymérisation et de polymérisation successives, ce qui leur permet d'explorer continuellement l'ensemble du cytoplasme. Cette propriété leur est souvent indispensable pour assurer leurs fonctions, et est donc extrêmement régulée dans la cellule, grâce à un ensemble de protéines variées. Certaines de ces dernières stabilisent le réseau de MTs, tandis que d'autres le déstabilisent. Durant les phases de division cellulaire, les MTs, grâce à leur caractère dynamique, forment le fuseau mitotique indispensable à la séparation des chromosomes entre les cellules filles.

Le travail présenté ici s'est intéressé à un aspect particulier de la régulation de la dynamique des microtubules dans les cellules épithéliales en interphase en condition de stress. Il s'inscrit dans la continuité des travaux menés préalablement au laboratoire concernant l'impact de la kinase de stress (JNK) sur la dynamique des MTs (**Daire *et al.*, 2009**). Les auteurs ont ainsi montré que JNK a un effet promoteur de la dynamique dans les cellules épithéliales, en augmentant à la fois les vitesses de polymérisation des MTs et leurs fréquences de sauvetage. Afin d'expliquer ces phénotypes, mon travail a consisté à rechercher comment cette kinase agit sur la dynamique microtubulaire en identifiant les substrats de la kinase dans l'environnement des MTs des cellules épithéliales. Je me suis plus particulièrement intéressée à deux candidats : la β -tubuline, qui est un constituant du corps

des MTs, et CLIP-170, qui est un facteur de sauvetage, recruté aux extrémités des MTs en croissance.

La première partie du travail a porté sur CLIP-170 car il s'agit d'un facteur de sauvetage majeur des MTs. Nous avons déterminé si CLIP-170 est un substrat de JNK, dans des cellules épithéliales en interphase ainsi qu'*in vitro*. Pour cela, nous avons analysé sa phosphorylation *in vivo* dans des situations de stress et d'activation de JNK, ainsi qu'*in vitro*. De plus, nous avons étudié l'impact des phosphorylations JNK-dépendantes de CLIP-170 sur la dynamique des MTs, ainsi que sur sa localisation cellulaire dans le réseau microtubulaire.

Dans un deuxième temps, la β -tubuline semblait être un bon candidat pour expliquer les effets de JNK sur la vitesse de polymérisation des MTs. L'objectif était donc de déterminer si la β -tubuline était un nouveau substrat de JNK et de caractériser sa phosphorylation éventuelle.

Introduction générale

Première partie : les microtubules

Les microtubules (MTs) sont des composants essentiels du squelette cellulaire. Le cytosquelette a été découvert en 1970 (**Fischer and Fowler, 2015 ; Larousserie, 2016**). C'est un réseau complexe et dynamique présent dans toutes les cellules eucaryotes. Il est constitué de trois types d'éléments : les filaments d'actine, les filaments intermédiaires et les MTs, tous formés par l'auto-assemblage de sous-unités protéiques spécifiques. Les sous-unités d'actine et de tubuline s'assemblent sous une forme liant des nucléotides (respectivement l'ATP et le GTP) et hydrolysent leurs liaisons gamma-phosphates après incorporation. Les trois éléments du cytosquelette présentent tous un caractère dynamique, qui leur permet de se renouveler en grande partie en quelques heures (**Fischer and Fowler, 2015**). Ceci permet aux cellules d'adapter continuellement leur morphologie et leur fonction. En plus de ces trois éléments, il a été proposé récemment que les septines soient considérées comme un quatrième composant du cytosquelette (**Mostowy and Cossart, 2012**). Cependant, pour certains biologistes, elles ne seraient pas un composant à part entière car elles sont toujours associées à un autre élément du cytosquelette (**Field and Kellogg, 1999**).

Les assemblages protéiques hautement dynamiques du cytosquelette sont à l'origine de ses fonctions dans le maintien de l'architecture des cellules, en conférant une résistance mécanique aux déformations, ou encore en permettant l'ancrage de la cellule à la matrice extracellulaire. Ils sont impliqués dans la migration, la division cellulaire, ainsi que le transport/trafic de vésicules membranaires et d'organites (**Fletcher and Mullins, 2010**). Un des rôles majeurs du cytosquelette est donc d'organiser spatialement et temporellement la cellule en lui permettant d'assurer ses fonctions spécifiques. Comment la cellule contrôle certaines de ses fonctions physiologiques via son cytosquelette, commence à être bien compris. Il reste cependant à mieux explorer, comment les polymères du cytosquelette peuvent intégrer ou transmettre des informations, pour permettre aux cellules de s'adapter aux changements de leur environnement.

Dans ce travail, nous nous sommes focalisés sur la dynamique des microtubules et sur sa régulation, notamment dans des conditions d'adaptation aux stress.

Les MTs sont des polymères qui s'auto-assemblent, qui sont polarisés et dynamiques. Dans les cellules la nucléation/polymérisation du MT requiert le plus souvent un centre de nucléation et des protéines régulatrices associées aux MTs, appelées *Microtubules-Associated Proteins* (MAPs). Pour assurer des fonctions biologiques très variées, la cellule utilise le transport unidirectionnel dépendant des moteurs moléculaires (dynéine et kinésine) médié par les MTs et elle différencie son réseau de MTs en de multiples sous-ensembles. Pour cela, elle s'appuie sur l'hétérogénéité d'expression d'isotypes de tubuline et sur un ensemble complexe de modifications post-traductionnelles (code de la tubuline).

I - Structure et composition des microtubules

A – Découverte des microtubules

L'étude des polymères du cytosquelette est une aire de recherche active depuis plus de 70 ans (**Fischer and Fowler, 2015**). Dès le début du XIX^{ème} siècle, le fuseau mitotique a été observé au microscope (**Larousserie, 2016**). Mais, les MTs ont été découverts il y a plus de 50 ans. Le terme « microtubule » a été utilisé pour la première fois en 1963, mais leur structure n'était pas observée dans toutes les cellules, car les méthodes de fixation utilisées ne permettaient pas de les préserver. L'introduction du glutaraldéhyde comme fixateur a permis d'identifier les MTs comme une structure du cytosquelette ubiquitaire en 1965 (**Borisy et al., 2016**). Puis, des travaux portant sur la mitose afin d'identifier et de purifier la protéine liant la colchicine, ont permis d'identifier la tubuline (**Borisy and Taylor, 1967a ; Borisy and Taylor, 1967b**).

Les MTs sont des polymères conservés dans toutes les cellules eucaryotes, depuis les levures (bourgeonnantes et fissipares), les champignons (**Galjart, 2005 ; cf. Figure 1**), les plantes (**Hashimoto, 2015**), jusqu'aux mammifères. Ils sont plus abondants dans les cellules nerveuses où ils représentent environ 10 à 20% des protéines totales. En effet, dans les neurones, les MTs sont des composés importants pour la polarisation neuronale (**Conde and Cáceres, 2009**). Lors de la mitose, le réseau microtubulaire s'organise afin de former le fuseau mitotique nécessaire pour la séparation des chromosomes (cf. **Figure 1**).

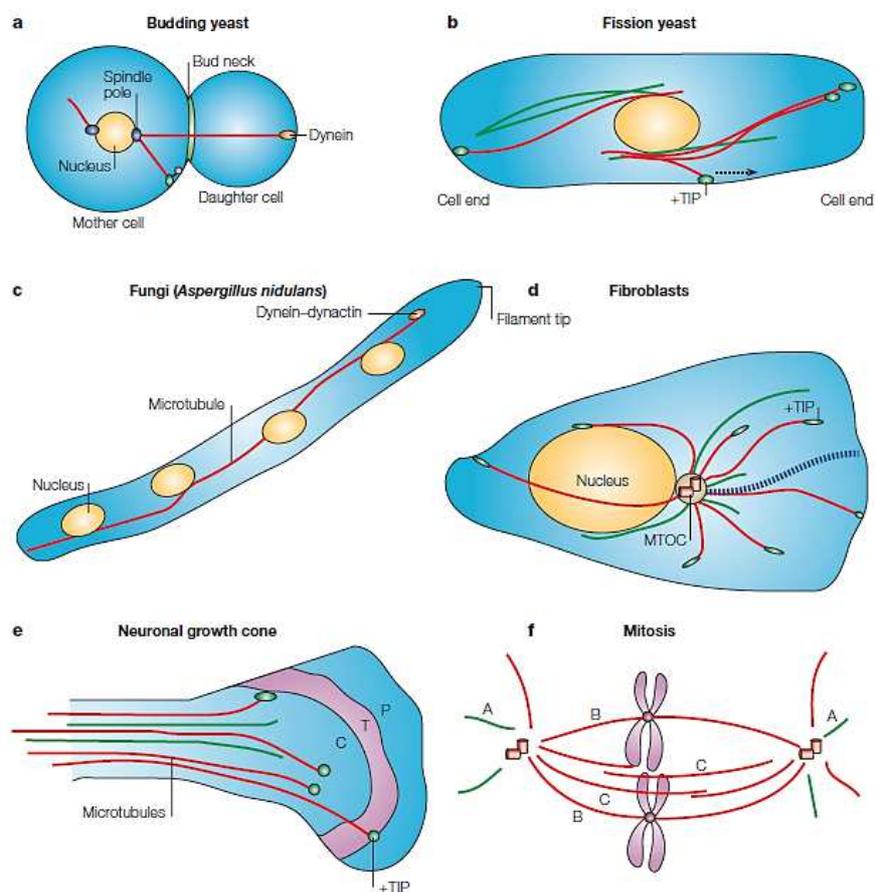


Figure 1 : Organisation du réseau microtubulaire dans différents types cellulaires (**Galjart, 2005**).

B – Structure des microtubules

Les MTs sont des polymères composés de dimères d' α/β -tubulines assemblés sous la forme de cylindres creux d'un diamètre d'environ 25 nm, ce qui en fait un composant rigide du cytosquelette dans les cellules eucaryotes. Ce sont des composés essentiels de structures stables comme les cils et flagelles, ainsi que de structures plus labiles comme le fuseau mitotique. C'est en 1980 que le mécanisme physico-chimique de l'assemblage des MTs a été découvert (Fischer and Fowler, 2015 ; Larousserie, 2016). L'unité de base constituant les MTs est un hétérodimère de 110 kDa, constitué des sous-unités α -tubuline et β -tubuline, qui sont associées tête à queue (Desai and Mitchison, 1997). La formation de protofilaments linéaires se fait également par l'association tête à queue de ces hétérodimères (cf. Figure 2). Puis, les protofilaments ainsi formés s'associent latéralement en un feuillet se refermant sur lui-même pour former la paroi cylindrique du microtubule (Chrétien *et al.*, 1995). Cet assemblage nécessite de l'énergie qui provient de l'hydrolyse du GTP (Kononova *et al.*, 2015). Habituellement, les microtubules sont constitués de 13 protofilaments donnant la structure tubulaire connue de 25 nm (cf. Figure 2). Néanmoins, il existe aussi des microtubules constitués de 11 à 15 protofilaments (Pilon and Poüs, 2013).

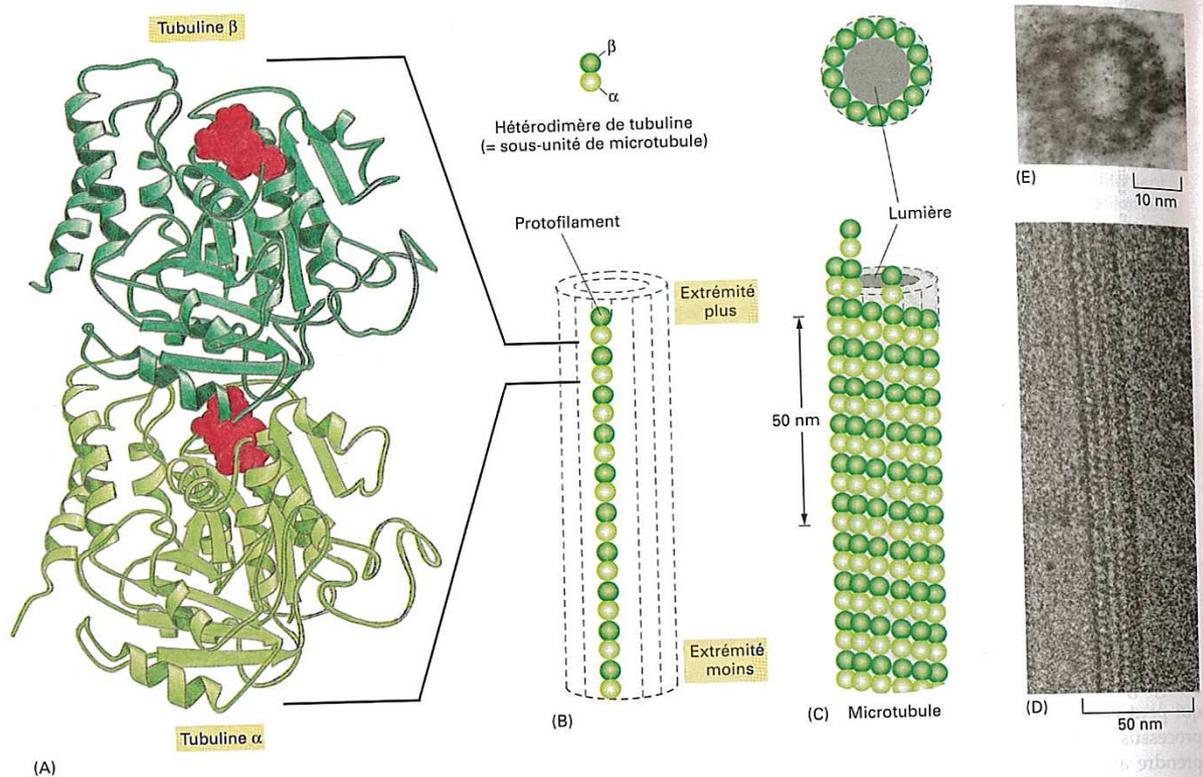


Figure 2 : Structure d'un microtubule et mise en évidence de ses sous-unités constitutives (Alberts, 2011). (A) Structure tridimensionnelle d'un hétérodimère d' α - et β -tubulines avec le site de fixation du GTP (en rouge). (B) Schéma montrant un protofilament polarisé, assemblé des sous-unités α - et β -tubulines. (C) Schéma d'un microtubule sous forme d'un tube formé de 13 protofilaments, alignés en « lattice B ». (D) Segment d'un MT observé en microscopie électronique. (E) Coupe transversale d'un MT observé en microscopie électronique.

Les microtubules sont stabilisés par des liens longitudinaux et latéraux non-covalents entre les sous-unités α/β -tubulines (Kononova *et al.*, 2015). Les microtubules sont principalement organisés en « lattice B », c'est-à-dire une structure dans laquelle les sous-

unités les plus proches entre deux protofilaments adjacents sont identiques (α -tubuline/ α -tubuline et β -tubuline/ β -tubuline) (Song and Mandelkow, 1993 ; cf. Figure 2). Néanmoins, au niveau du sillon qui résulte du rapprochement des protofilaments externes du feuillet lors de la formation du tube, les MTs adoptent une conformation en « *lattice A* » dans laquelle les sous-unités voisines entre les protofilaments adjacents sont différentes (α -tubuline/ β -tubuline et β -tubuline/ α -tubuline).

Grâce à la microscopie électronique, la structure tubulaire des MTs assemblés *in vitro* peut être observée (cf. Figure 2). La longueur des MTs est variable et peut atteindre quelques dizaines de micromètres, du fait de leur dynamique (Wade and Hyman, 1997). En raison de l'assemblage polarisé de la tubuline, les MTs ont deux extrémités distinctes (dites extrémités « plus » ou (+) et « moins » ou (-)), de propriétés chimiques différentes, conférant aux MTs une polarité intrinsèque (cf. Figure 2). L'extrémité (+) présente en général *in vivo* un comportement plus dynamique que l'extrémité (-), avec des phases de polymérisation et de dépolymérisation alternées. Nous détaillerons la polarité des MTs un peu plus loin dans ce travail (cf. page 41).

L'assemblage des MTs et leur dépolymérisation vont dépendre de l'état GDP ou GTP de la tubuline. Quand un MT croît, l' α -tubuline nouvellement incorporé vient compléter la poche GTP de la β -tubuline précédente (Nogales *et al.*, 1998 ; Nogales *et al.*, 1999). Chaque monomère de tubuline est capable de lier une molécule de GTP dans un site non échangeable et non hydrolysable pour l' α -tubuline (site N), échangeable et hydrolysable pour la β -tubuline (site E) (Fischer and Fowler, 2015). Pour la β -tubuline, le GTP est hydrolysé lors de la polymérisation du MT (cf. Figure 3). Par contre, dans le site N de l' α -tubuline, le GTP est non échangeable car sa sortie est bloquée par l'interaction avec la sous-unité β du dimère (cf. Figure 3).

L'énergie provenant de l'hydrolyse du GTP est stockée dans la fibre et est libérée lors du désassemblage, autorisant le comportement dynamique des MTs (Galjart, 2005). L'hydrolyse du GTP n'est pas immédiate après l'incorporation d'un nouvel hétérodimère, mais est stimulée par l'incorporation de nouvelles sous-unités de tubuline. Ainsi, à l'extrémité (+) des MTs, l'interaction entre la sous-unité α - du dernier dimère incorporé et la sous-unité β du dimère précédent favoriserait un léger compactage longitudinal du protofilament sans altérer les interactions latérales entre les protofilaments et stimulerait l'activité GTPase de la sous-unité β (Alushin *et al.*, 2014). Ce retard à l'hydrolyse est à l'origine de la formation d'une coiffe de tubuline-GTP (« GTP cap »). Cette dernière permettrait la stabilisation des extrémités (+) du MT en les protégeant d'événements de dépolymérisation (Hyman *et al.*, 1992 ; cf. Figure 3). Une coiffe composée de 13 à 14 sous-unités de tubuline-GTP est suffisante pour stabiliser les MTs (Drechsel and Kirschner, 1994 ; Caplow and Shanks, 1996). À l'opposé, l'exposition de sous-unités de tubuline-GDP à l'extrémité du MT favoriserait sa dépolymérisation. En effet, *in vivo*, les protofilaments de tubuline-GDP adopteraient plus facilement une conformation courbée entraînant la perte des interactions latérales entre protofilaments adjacents et jouant ainsi un rôle sur la stabilité du MT. (Galjart, 2005 ; Brouhard, 2015 ; cf. Figure 3). La tubuline-GTP et la tubuline-GDP adoptent une conformation courbée. Elles sont à l'origine de la formation de protofilaments droits lors de la

polymérisation et de protofilaments recourbés lors de la dépolymérisation des MTs (cf. **Figure 3**). (Melki *et al.*, 1989 ; Brouhard and Rice, 2014).

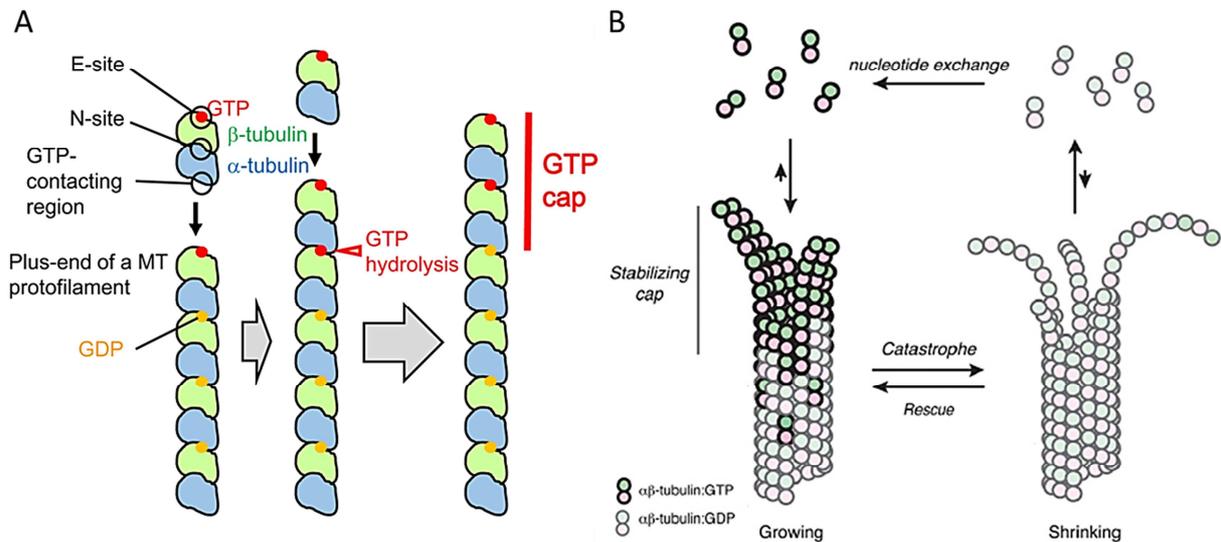


Figure 3 : Rôle du GTP dans la structure des microtubules. (A) Formation de la « coiffe de tubuline-GTP » (Hashimoto, 2015). Le cycle de polymérisation des microtubules. La tubuline-GTP s'incorpore à l'extrémité (+) des microtubules créant une coiffe GTP qui empêche la dépolymérisation. (B) Quand le GTP est hydrolysé en GDP, le MT devient instable et dépolymérise avec perte des interactions latérales entre protofilaments adjacents secondaires. Quand le GDP est remplacé par du GTP dans les sous-unités de tubuline dépolymérisantes, le cycle peut recommencer à nouveau (Brouhard and Rice, 2014).

Nous pouvons noter qu'*in vitro*, les MTs sont fréquemment courts et droits, tandis qu'*in vivo*, ils peuvent être longs et courbés. Cette courbure peut contribuer pour une part à l'interaction de MAPs (*Microtubule-Associated Proteins* ; cf. **page 75**) spécifiques (Kikkawa *et al.*, 1994 ; Brouhard and Rice, 2014).

C – Composition des microtubules : la tubuline

Après la découverte de la tubuline il y a 51 ans par Borisy et Taylor, de nombreuses études ont été menées afin de caractériser cette protéine. Les tubulines constituent ainsi une famille multigénique qui compte sept membres : α , β , γ , δ , ϵ , ζ et η (Dutcher, 2001 ; Ludueña, 2013). La famille des tubulines représente environ 3-4% de la quantité totale de protéines d'une cellule (Oakley, 2000). Chez les eucaryotes, ces tubulines sont ubiquitaires.

Les sous-unités α - et β -tubulines sont les constituants des microtubules. Les monomères d' α - et β -tubulines sont structuralement similaires, avec une taille de 4-5 nm et une masse moléculaire d'environ 55 kDa (~ 450 acides aminés). Néanmoins, ces deux sous-unités de tubuline ne partagent que 40% d'identité de séquence en acides aminés (Nogales, 2000). Ce sont des protéines globulaires qui s'organisent spontanément de façon non covalente sous la forme d'un hétérodimère stable α/β en présence de GTP (Fischer and Fowler, 2015).

La γ -tubuline en se localisant principalement au niveau du centrosome a un rôle majeur dans la nucléation des microtubules. Les δ -tubuline, ϵ -tubuline, ζ -tubuline et η -tubuline sont retrouvées dans les centrioles qui sont les composants du centrosome, le centre organisateur majeur des MTs (cf. **page 43**). Ces tubulines (δ , ϵ , ζ et η) peuvent également être

impliquées dans l'assemblage du fuseau mitotique et la division cellulaire (McKean *et al.*, 2001).

Ici, nous nous sommes intéressés uniquement aux α - et β -tubulines qui constituent les MTs.

C1 – Les domaines fonctionnels des sous-unités α et β de la tubuline

Les α - et β -tubulines sont constituées de trois grands domaines fonctionnels distincts (Nogales *et al.*, 1998 ; cf. Figure 4). En N-terminal se trouve le site de liaison au GTP. Ces deux tubulines présentent un domaine intermédiaire comprenant notamment pour la β -tubuline le site de fixation au Taxol® (un agent stabilisateur des MTs). Leur domaine C-terminal est généralement impliqué dans la fixation des protéines associées aux microtubules (MAPs ; cf. page 75). Leur queue C-terminale est peu structurée et est chargée négativement, tandis que, le corps des tubulines (régions N-terminale et intermédiaire) est très conservé de la levure *Saccharomyces cerevisiae* à l'homme (cf. Figure 4). La séquence de la queue C-terminale est plus variable entre organismes, ainsi qu'entre isoformes de tubuline d'un même organisme (cf. Figure 5).

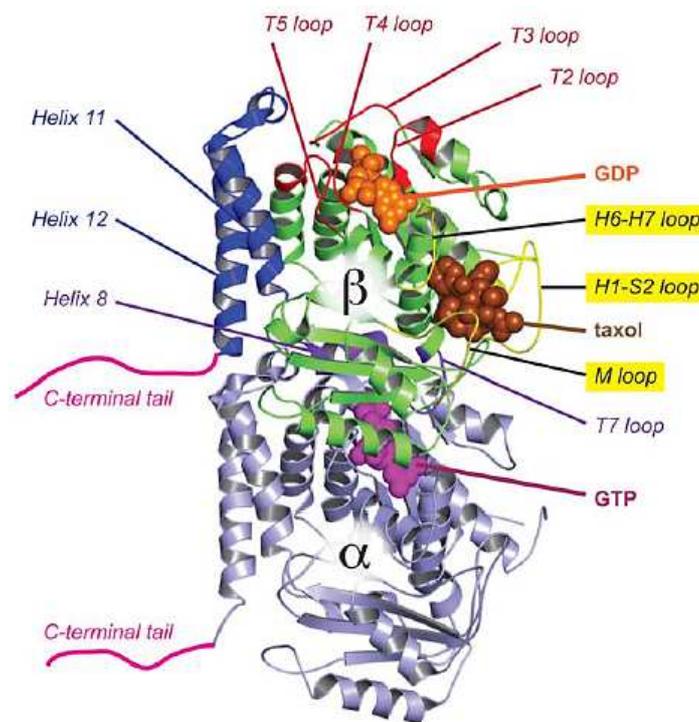


Figure 4 : Structure tridimensionnelle d'un hétérodimère d' α / β -tubuline (numéro d'accèsion 1JFF dans la PDB). Dans la structure de la β -tubuline, sont indiquées : les boucles T2, T3, T4, T5 (en rouge) et H1-S2 (en jaune) du domaine N-terminal, mais aussi les boucles M, H6-H7 (en jaune), et la boucle T7 et l'hélice H8 (en bleu-violet) du domaine intermédiaire, ainsi que les hélices H11 et H12 (en bleu) du domaine C-terminal. Les sites de liaison au GDP (en orange), au GTP (en rose-violet) et au Taxol® (en marron) sont aussi montrés. Les queues C-terminales désordonnées des α - et β -tubulines (en rose) ne sont pas résolues dans la structure cristalline (Chakraborti *et al.*, 2016).

Des études *in vitro* montrent que la réduction des charges négatives dans le domaine C-terminal de l' α / β -tubuline (en changeant les acides aminés en des résidus neutres) augmente sa capacité d'auto-assemblage en MTs et diminue ses interactions avec les MAPs

(Mejillano and Himes, 1991), ou encore stabilise les MTs (Mejillano *et al.*, 1992). Ces résultats sont similaires à ceux obtenus avec de la tubuline tronquée de sa queue C-terminale (Vera *et al.*, 1989). De tels MTs sont même plus stables que des MTs dits natifs, indiquant que, les MAPs peuvent déstabiliser les MTs (Mejillano and Himes, 1991 ; Mejillano *et al.*, 1992). La queue C-terminale de la tubuline est positionnée à la surface du MT, ce qui permet de multiples interactions avec les autres protéines dans l'environnement microtubulaire (Westermann and Weber, 2003). En effet, elle peut réguler l'interaction de moteurs ou de MAPs avec les MTs, ainsi qu'influencer les propriétés de polymérisation de la tubuline (Yu *et al.*, 2015). Une étude a ainsi montré que l'absence du domaine C-terminal de la tubuline réduit la processivité des deux moteurs, la kinésine et la dynéine (Wang and Sheetz, 2000).

D – Hétérogénéité des sous-unités α et β de la tubuline

Des similarités structurelles sont retrouvées entre la protéine bactérienne FtsZ impliquée dans la division cellulaire et la tubuline. Cela semble indiquer que ces deux protéines proviennent d'un ancêtre commun. De plus, la tubuline est très conservée dans l'évolution des eucaryotes, y compris au plan structural (Gadadhar *et al.*, 2017). Malgré cela, la tubuline montre aussi un haut degré d'hétérogénéité (Ludueña, 2013). L'hétérogénéité de la tubuline provient d'une diversité génétique qui est à l'origine de différentes isoformes et d'isotypes. Le nom « isoforme » est donné à des formes protéiques provenant d'un épissage alternatif ou ayant subi des modifications post-traductionnelles et le nom « d'isotype » est donné à des protéines provenant de l'expression de gènes différents.

D1 – Les isotypes de l' α - et la β -tubuline

Chez les mammifères, plusieurs gènes phylo-génétiquement conservés codent les α -tubulines et β -tubulines (cf. **Tableau 1**), mais différents noms leur ont été attribués dans la littérature (la nomenclature est référencée dans le site : <http://www.genenames.org/cgi-bin/genefamilies/set/778>).

Isotype de la tubuline	Nom du gène	Numéro d'accès	Spécificité cellulaire
Les isotypes de la sous-unité α de la tubuline			
α -tubuline 1a	TUBA1A	NP_006000	Ubiquitaire, Cerveau
α -tubuline 1b	TUBA1B	AAC31959	Ubiquitaire, Cerveau
α -tubuline 1c	TUBA1C	Q9BQE3	Ubiquitaire, Cerveau
α -tubuline 3c	TUBA3C	Q13748	Cœur, Testicules
α -tubuline 3e	TUBA3E	NP_997195	Cœur, Testicules
α -tubuline 4a	TUBA4A	NP_005991	Ubiquitaire
α -tubuline 8	TUBA8	Q9NY65	Cœur, Cerveau, Testicules, Muscle squelettique
α -tubuline like 3	TUBAL3	NP_079079	Colon, Duodénum, Rein, Petit intestin

Tableau 1 (début)

Les isotypes de la sous-unité β de la tubuline

β -tubuline I	TUBB	NM_178014	Ubiquitaire, Cerveau
β -tubuline II	TUBB2A, TUBB2B	NM_001069 ; NM_178012	Cerveau
β -tubuline III	TUBB3	NM_006086	Cerveau, Testicules
β -tubuline IVa	TUBB4	NM_006087	Cerveau, Testicules
β -tubuline IVb	TUBB2C	NM_006088	Ubiquitaire
β -tubuline V	TUBB6	NM_032525	Ubiquitaire, Cœur
β -tubuline VI	TUBB1	NM_030773	Moelle osseuse, Poumon, Foie, Rate, Testicules

Tableau 1 : Isotypes des sous-unités α et β de la tubuline chez l'homme (d'après **Parker et al., 2014**). La spécificité cellulaire est déterminée d'après des données de séquençage des ARNs de 20 tissus humains (d'après **NCBI Gene**, <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/gene/>).

Les différents isotypes d' α - et β -tubulines sont exprimées dans divers tissus (cf. **Tableau 1**) et forment une famille multigénique qui génère un premier niveau de la diversité microtubulaire. Chez une même espèce, la plus grande variabilité de séquence entre les isotypes de tubuline est retrouvée dans la queue C-terminale (**Westermann and Weber, 2003** ; cf. **Figure 5**). L'implication de cette région dans l'interaction avec les MAPs (cf. **page 75**) souligne l'importance de l'hétérogénéité des isotypes de tubuline sur la régulation de la stabilité et les fonctions des microtubules dans la cellule (**Nogales et al., 1998**). Ainsi, il a été montré que la dynamique des MTs est influencée par leur composition en isotypes de tubuline (**Vemu et al., 2017**). Par exemple, des MTs polymérisés *in vitro* avec de l' α/β III-tubuline sont plus dynamiques que ceux polymérisés avec de la tubuline des classes α/β II et α/β IV (**Panda et al., 1994**). Ce paramètre influence aussi le comportement de la cellule vis-à-vis des agents anti-mitotiques (cf. **page 69**). Dans les cellules cancéreuses les isotypes (β I, β II, β III, β IVa et β V) sont surexprimées et augmentent les fréquences de catastrophe, mais ne sont pas des oncogènes. Ce changement de la composition en isotypes de tubuline peut déterminer la réponse au traitement des patients, en contribuant à l'agressivité de la maladie, ainsi que la sensibilité aux agents anti-mitotiques (**Parker et al., 2017**). Par exemple, il a été montré que l'expression accrue de la β III-tubuline est associée à une augmentation de la résistance au Taxol® dans des cellules cancéreuses (**Derry et al., 1997**).

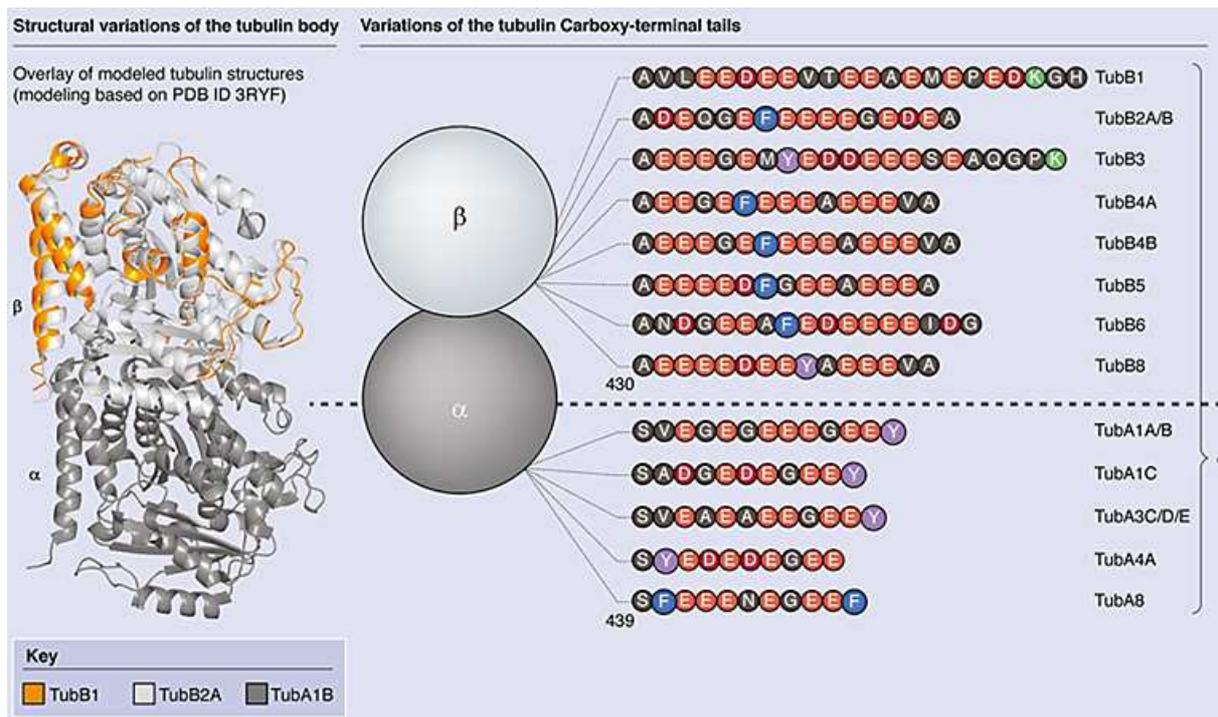


Figure 5 : Variation structurales du corps de la séquence C-terminale selon les isotypes de l' α - et la β -tubuline dans les cellules humaines (Chakraborti *et al.*, 2016 ; Gadadhar *et al.*, 2017).

D2 – Les mutations dans les isotypes des sous-unités α et β de la tubuline

En cherchant à comprendre les fonctions des isotypes de tubuline dans les organismes et les cellules, des mutations spécifiques de ces derniers ont été découvertes. La plupart de ces mutations ont été identifiées dans des maladies neurodégénératives ou touchant le développement du système nerveux (Tischfield *et al.*, 2011). En effet, malgré le fait que les isotypes de tubuline sont exprimés en parallèle dans divers tissus et cellules, beaucoup de malformations cérébrales (tubulinopathies) sont causés par la mutation d'un seul ou de six gène(s) de tubuline abondamment exprimé(s) dans le cerveau, comme les TUBA1A, TUBA8, TUBB, TUBB2A, TUBB2B, ou TUBB3 (Chakraborti *et al.*, 2016 ; Bahi-Bouisson and Cavallin, 2016 ; cf. Figure 6). Un grand nombre de mutations altère les propriétés dynamique et les fonctions des MTs, en réduisant le nombre d'hétérodimères de tubuline fonctionnels, ainsi qu'en causant des altérations de la liaison du GTP et la destruction des interactions avec les protéines associées aux MTs (Romaniello *et al.*, 2015 ; cf. Figure 6). Par exemple, la mutation (D417H ou R262H) dans la β -tubuline III (TUBB3) humaine, près du site de liaison à la kinésine, mais loin du site de liaison au GTP et des contacts entre les sous-unités, affecte *in vitro* l'instabilité dynamique des deux extrémités des MTs, en diminuant les événements de dépolymérisation (Ti *et al.*, 2016 ; cf. Figure 6). *In vivo* il a été montré que la mutation (R264C) du gène TUBA1A humain cause une lissencéphalie, en diminuant la formation de novo des hétérodimères de tubuline (Tian *et al.*, 2008). *In vitro* neuf mutations différentes dans le gène TUBA1A humain (I188L, I238V, P263T, L236F, V303G, L397P, R402C, S419L) sont à l'origine de défauts dans la formation *de novo* d'hétérodimères (Tian *et al.*, 2010). Ces mutations induisent des défauts dans le repliement des tubulines, médié par des protéines chaperonnes, et des défauts dans la voie d'hétérodimérisation de l' α - et la β -

tubuline (**Tian *et al.*, 2008 ; Tian *et al.*, 2010 ; cf. Figure 6**). Chez la souris, la mutation (S140G) dans le gène *Tuba1* (homologue du gène humain TUBA3) au niveau du site de liaison au GTP, affecte aussi la formation des hétérodimères de tubuline. Des mutations dans le gène *TuBB4A* (cf. **Figure 6**) affectent les neurones ou les oligodendrocytes en fonction de l'acide aminé muté (**Chakraborti *et al.*, 2016**).

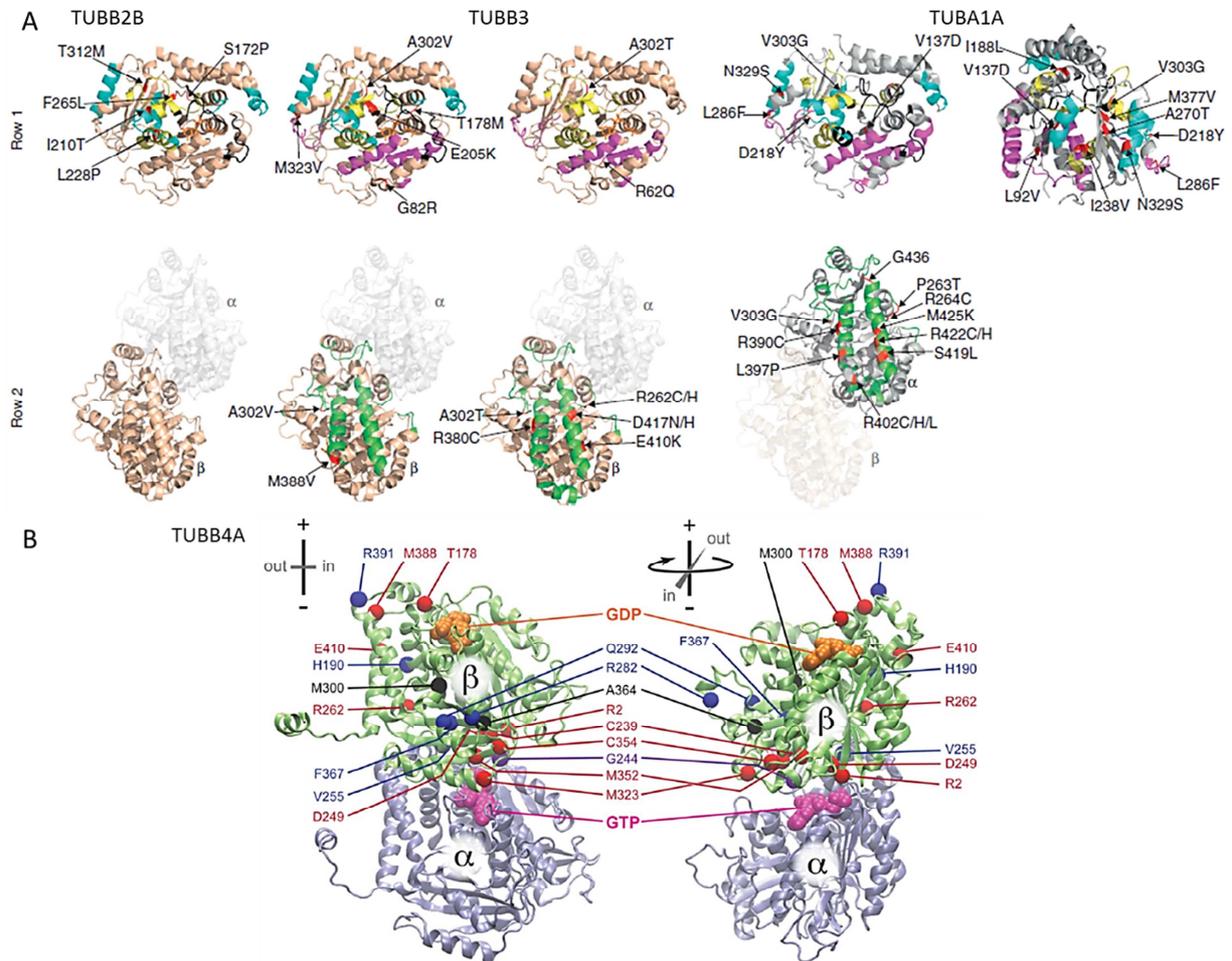


Figure 6 : Diverses mutations découvertes dans les hétérodimères d'α/β-tubulines. (A) Mutations identifiées dans les gènes TUBB2B, TUBB3 et TUBA1A humains à l'origine de tubulinopathies. Les cinq mutations connues de TUBB2B sont impliquées dans une anomalie locale du cortex cérébral (la polymicrogyrie), tandis que les six ou huit mutations dans TUBB3 sont associées à des malformations neuronales dues à une anomalie du développement cortical ou une maladie génétique très rare (la fibrose congénitale des muscles oculo-moteurs de type 3). Les mutations du gène TUBA1A causent des malformations du développement cortical, ainsi que la lissencéphalie (d'après **Tischfield *et al.*, 2011**). (B) Structure moléculaire du gène TUBB4A humain avec ses mutations. Les sites de liaison au GDP (en orange) et au GTP (en rose), ainsi que le positionnement et le numéro des acides aminés mutés impliqués dans des pathologies humaines (sphères) sont indiqués dans les sous-unités β (en vert) et α de la tubuline (en gris). Parmi les résidus identifiés, certains sont associés à des défauts structuraux dans les neurones (sphères rouges), ou dans les oligodendrocytes sans affecter les neurones (sphères bleues), ou encore dans les neurones et les oligodendrocytes (sphère violette). Pour certains résidus les effets de leur mutation sont inconnus (sphères noires) (**Chakraborti *et al.*, 2016**).

Malgré le nombre d'étude, aucune mutation des isotypes des α- et β-tubulines n'a encore été retrouvée dans les cancers (**Breuss *et al.*, 2017**).

D3 – Les modifications post-traductionnelles (MPTs) des sous-unités α et β -tubuline

En plus de leur hétérogénéité génique, les sous-unités α - et β -tubulines peuvent subir un vaste répertoire de modifications post-traductionnelles (MPTs) pour la plupart réversibles (Janke and Bulinski, 2011 ; cf. Figure 7). Les différentes modifications post-traductionnelles connues à ce jour sont rassemblées dans le tableau ci-dessous (cf. Tableau 2). Ces MPTs sont chimiquement diverses et constituent le code de la tubuline qui est lu par des effecteurs cellulaires (Verhey and Gaertig, 2007).

Modifications post-traductionnelles	Références
Détyrosination/Retyrosination	Barra <i>et al.</i> , 1973 ; Arce <i>et al.</i> , 1975 ; Hallak <i>et al.</i> , 1977 ; Argaraña <i>et al.</i> , 1978 ; Argaraña <i>et al.</i> , 1980 ; Ersfeld <i>et al.</i> , 1993 ; Kalinina <i>et al.</i> , 2007
Déglutamylations conduisant aux $\Delta 2$ - et $\Delta 3$ -tubulines (non réversibles)	Paturle-Lafanechère <i>et al.</i> , 1994 ; Lafanechère and Job, 2000 ; Aillaud <i>et al.</i> , 2016
Acétylation	L'Hernault and Rosenbaum, 1985 ; LeDizet and Piperno, 1987 ; Iwabata <i>et al.</i> , 2005 ; Choudhary <i>et al.</i> , 2009 ; Akella <i>et al.</i> , 2010 ; Chu <i>et al.</i> , 2011 ; Soppina <i>et al.</i> , 2012 ; Liu <i>et al.</i> , 2015
(Poly)Glutamylation	Eddé <i>et al.</i> , 1990 ; Redeker <i>et al.</i> , 1992 ; Janke <i>et al.</i> , 2005 ; Ikegami <i>et al.</i> , 2006 ; Ikegami <i>et al.</i> , 2007 ; van Dijk <i>et al.</i> , 2007 ; Wloga <i>et al.</i> , 2008 ; Mukai <i>et al.</i> , 2009 ; Ikegami <i>et al.</i> , 2010
(Poly)Glycylation	Redeker <i>et al.</i> , 1994 ; Iftode <i>et al.</i> , 2000 ; Ikegami and Setou., 2009 ; Rogowski <i>et al.</i> , 2009 ; Wloga <i>et al.</i> , 2009
Phosphorylation	Eipper, 1972 ; Gard and Kirschner, 1985 ; Matten <i>et al.</i> , 1990 ; Díaz-Nido <i>et al.</i> , 1990 ; Faruki <i>et al.</i> , 2000 ; Mitsopoulos <i>et al.</i> , 2003 ; Yoshida <i>et al.</i> , 2003 ; Fourest-Lieuvin <i>et al.</i> , 2006 ; Ma and Sayeski, 2007 ; Ban <i>et al.</i> , 2013 ; Fujita <i>et al.</i> , 2013 ; De <i>et al.</i> , 2014 ; Ito <i>et al.</i> , 2014 ; Law <i>et al.</i> , 2014 ; Isshiki <i>et al.</i> , 2015 ; Liu <i>et al.</i> , 2015 ; Ori-McKenney <i>et al.</i> , 2016 ; Sgrò <i>et al.</i> , 2016
Méthylation	Iwabata <i>et al.</i> , 2005 ; Xiao <i>et al.</i> , 2010 ; Soppina <i>et al.</i> , 2012 ; Park <i>et al.</i> , 2016
Polyamination	Song <i>et al.</i> , 2013
Palmitoylation	Caron, 1997a ; Ozols and Caron, 1997 ; Zambito and Wolff, 1997 ; Caron <i>et al.</i> , 2001
Arginylation	Wong <i>et al.</i> , 2007
S-nitrosylation	Jaffrey <i>et al.</i> , 2001
Ubiquitylation	Ren <i>et al.</i> , 2003 ; Huang <i>et al.</i> , 2009 ; Liu <i>et al.</i> , 2015
Sumoylation	Rosas-Acosta <i>et al.</i> , 2005
Glycosylation	Hino <i>et al.</i> , 2003 ; Cicchillitti <i>et al.</i> , 2008 ; Liu <i>et al.</i> , 2015

Tableau 2 : Modifications post-traductionnelles (MPTs) connues des sous unités α et β de la tubuline (d'après Wloga and Gaertig, 2010 ; Yu *et al.*, 2015 ; Gadadhar *et al.*, 2017).

Ces modifications post-traductionnelles sont conservées dans l'évolution et abondamment représentées dans les MTs cellulaires. La plupart de ces modifications s'accumulent sur des microtubules stables, c'est-à-dire à demi-vie longue. Ainsi, elles peuvent servir de marqueurs de stabilité pour les MTs. La plupart de ces modifications sont générées sur les polymères permettant ainsi la formation de sous-réseaux microtubulaires distincts. Plusieurs études ont montré qu'une même molécule de tubuline peut présenter diverses modifications post-traductionnelles (Wloga and Gaertig, 2010 ; Yu *et al.*, 2015 ; Gadadhar *et al.*, 2017).

Après leur identification, l'étude des MPTs a été poursuivie avec la découverte des enzymes impliquées (Janke *et al.*, 2005 ; van Dijk *et al.*, 2007 ; Rogowski *et al.*, 2009 ; Wloga *et al.*, 2009 ; Rogowski *et al.*, 2010 ; Akella *et al.*, 2010). Ces enzymes peuvent subir une régulation spatio-temporelle (Fischer and Fowler, 2015), et montrent des spécificités d'expression tissulaire et de localisation subcellulaire. Elles sont très conservées et sont essentielles pour un développement normal (Erck *et al.*, 2005 ; Ikegami *et al.*, 2007 ; Rogowski *et al.*, 2010), montrant leur importance dans la physiologie cellulaire. Le niveau de ces MPTs peut aussi être modifié en pathologie, et, de ce fait, a été proposé comme marqueur de certains cancers et désordres neurologiques (Garnham and Roll-Mecak, 2012).

La majorité des MPTs est retrouvée dans tous les derniers acides aminés de la queue C-terminale des molécules soit de l' α -tubuline, comme c'est le cas pour la détyrosination/retyrosination et les déglutamylation de la tubuline détyrosinée, soit des molécules α - et β -tubulines, pour la (poly)glutamylation et la (poly)glycylation (cf. Figure 7). Les autres modifications, telles que la palmitoylation, la phosphosrylation, la S-nitrosylation et la polyamination touchent aussi la région C-terminale (cf. Figure 7). Les modifications de la Lys40 (acétylation, méthylation), en N-terminal de l' α -tubuline sont les seules à se faire dans la lumière des MTs (Soppina *et al.*, 2012).

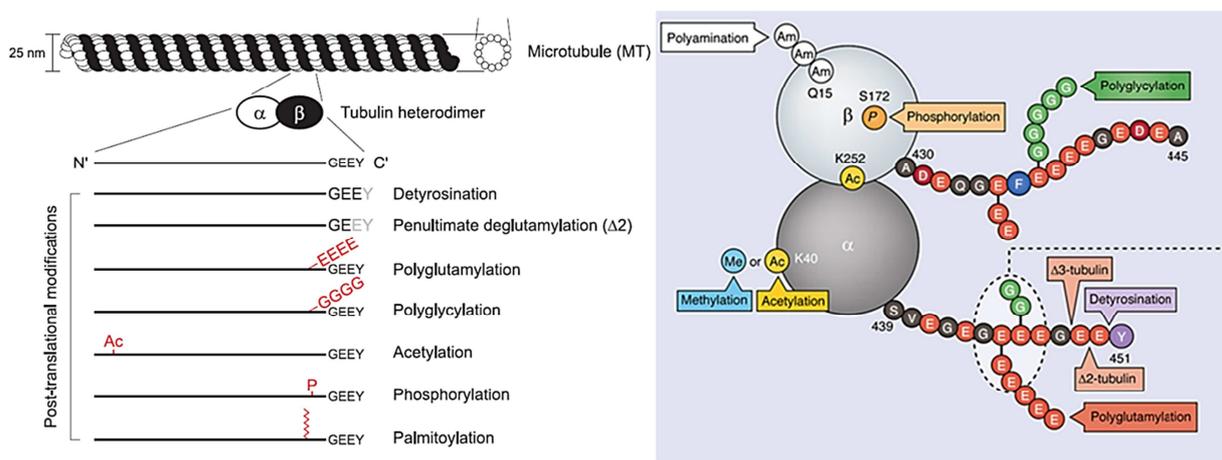


Figure 7 : Localisation des modifications post-traductionnelles des sous-unités α et β de la tubuline (Ikegami and Setou, 2010 ; Gadadhar *et al.*, 2017).

La combinaison de nombreuses MPTs de la tubuline est décrite comme un code complexe, pouvant être lu par les MAPs (*Microtubules-Associated Proteins* ; cf. page 75) et d'autres protéines spécifiques (Verhey and Gaertig, 2007 ; Gadadhar *et al.*, 2017). Elles déterminent des architectures et des dynamiques de MTs distinctes dans la cellule. Les MTs stables acquièrent plusieurs modifications post-traductionnelles, comme l'acétylation de l' α -

tubuline, et/ou sa détyrosination C-terminale (Galjart, 2005). Après la dépolymérisation des MTs modifiés, la plupart des modifications sont réversées par d'autres enzymes spécifiques. Par exemple, c'est le cas de la retyrosination de l' α -tubuline par la tubuline tyrosine ligase (TTL) (Prota *et al.*, 2013b). Durant cette étude, nous nous sommes plus particulièrement intéressés à la phosphorylation des tubulines.

D3a – Les phosphorylations des tubulines

La phosphorylation consiste en l'ajout d'un groupement phosphate sur les résidus OH, résultant en l'estérification de la chaîne latérale d'un acide aminé tel que la sérine, la thréonine ou la tyrosine.

La phosphorylation de la β -tubuline a été originellement identifiée dans de la tubuline de cerveau de rat (Eipper, 1972). Cependant, elle n'est pas bien caractérisée et ses effets restent mal connus, probablement à cause de l'existence de plusieurs sites de phosphorylation.

L'une des premières études fonctionnelle, a mis en évidence la phosphorylation de la Ser172 de la β -tubuline par la protéine kinase Cdk1 (*Cyclin-dependent kinase 1*) lors de la mitose (cf. Figure 7). Cette phosphorylation affecte l'assemblage des MTs en diminuant l'incorporation des hétérodimères de tubulines. Elle impacte donc la dynamique des MTs en mitose (Fourest-Lieuvin *et al.*, 2006). Contrairement à la plupart des modifications post-traductionnelles s'effectuant sur de la tubuline polymérisée, cette phosphorylation s'opère sur de la tubuline libre.

Lors de la recherche de protéines impliquées dans le développement anormal des dendrites, Ori-McKenney et son équipe ont identifiés une autre kinase qui phosphoryle la β -tubuline également sur la Ser172. Celle-ci est la MNB (*Minibrain*) de la drosophile, qui a 82% d'identité avec son homologue humaine DYRK1a (*Dual-Specificity Tyrosine-Regulate Kinase 1a*). À partir d'approches *in vivo* et *in vitro*, les chercheurs ont mis en évidence que MNB/DYRK1a phosphoryle directement la Ser172 de la β -tubuline, conduisant à l'inhibition de la polymérisation des MTs, pendant la morphogénèse des dendrites (Ori-McKenney *et al.*, 2016).

Dans une autre étude, il a été montré que la perte de l'expression de la CiT-K (*Citron-Kinase*) pendant la cytokinèse, conduisait à la déstabilisation des MTs, du fait d'une diminution de la phosphorylation de la Ser444 de la β -tubuline-III (TUBB3). Les auteurs ont montré que CiT-K provoque cette phosphorylation via un mécanisme indirect, c'est-à-dire en interagissant avec la β -tubuline et en recrutant la CK2 α (*Casein Kinase-2 α*) (Sgrò *et al.*, 2016), pour phosphoryler la Ser444 (Díaz-Nido *et al.*, 1990). La Ser444 de la β -tubuline-III (TUBB3) est également connue pour être phosphorylée par GRK2 (*G-protein coupled Receptor Kinase 2*) (Yoshida *et al.*, 2003).

Par ailleurs, les kinases LRRK2 et DAPK2, s'associent aux sous-unités β -tubuline sans que des phosphorylations n'aient été démontrées (Law *et al.*, 2014 ; Isshiki *et al.*, 2015). Cependant, les auteurs ont montré que la kinase LRRK2 (*Leucine-Rich Repeat Kinase 2*) se lie directement à trois sous-unités β -tubuline dans la lumière des MTs et empêche l'acétylation de l' α -tubuline (Law *et al.*, 2014). De même, l'association de DAPK2 (*Death-Associated Protein Kinase 2*) à la β -tubuline favorise l'induction de l'apoptose par le nocodazole (Isshiki *et al.*, 2015).

En plus de ces kinases spécifiques, il existe des kinases qui phosphorylent à la fois les sous unités α et β de la tubuline.

Plusieurs kinases, incluant des tyrosines kinases, la calcium/calmoduline-kinase de type II, la kinase dépendante de l'AMPc (PKA), les caséines-kinases I et II et la phosphatidylinositol-3-kinase, sont en effet capables de phosphoryler les deux sous-unités sur différents sites (MacRae, 1997). Parmi les tyrosines kinases, pp60^{c-src} codée par le gène *src*, phosphoryle directement l' α - et la β -tubuline dans des cônes de croissance enrichis en membranes, de cerveau de rat fœtal (Matten *et al.*, 1990). L' α -tubuline, elle, est phosphorylée sur une tyrosine non identifiée près de sa queue C-terminale par la tyrosine kinase Syk (Peters *et al.*, 1996 ; Faruki *et al.*, 2000). Quant à la tyrosine kinase Fes, elle phosphoryle fortement *in vitro* une tyrosine sur de la tubuline purifiée. Fes favorise aussi *in vitro* la polymérisation de la tubuline (Laurent *et al.*, 2004). Concernant Jak2, cette tyrosine kinase s'associe via son domaine pseudo-kinase aux hétérodimères solubles de la tubuline, mais aussi aux polymères (MTs) insolubles, pour phosphoryler ces substrats dans la tubuline (Ma and Sayeski, 2007). Enfin, il y a été montré que les sous-unités α et β de la tubuline sont phosphorylées *in vitro* par PSK (*Prostate-derived Sterile 20-like Kinase*), une sérine/thréonine kinase appartenant à la famille des STE20 (*Sterile 20-like kinases*, impliqué dans la voie des MAPKs (*Mitogen-Activated Protein Kinases* ; cf. page 173) (Mitsopoulos *et al.*, 2003).

Récemment, une approche en spectrométrie de masse sur de la tubuline purifiée à partir de cellules HeLa a révélé des anciens mais aussi des nouveaux sites de phosphorylations (Liu *et al.*, 2015 ; cf. Tableau 3). Il est important de noter que la phosphorylation semble avoir un rôle important dans la régulation des MTs. Par exemple, la phosphorylation de l' α -tubuline réduit la stabilité des MTs. En effet, les MTs contenant de la tubuline phosphorylée dépolymérisent plus vite que ceux contenant de la tubuline non phosphorylée (Liu *et al.*, 2015).

Sites potentiels de phosphorylation (identifiés en spectrométrie de masse en tandem à haute résolution)	
Nouvellement identifiées dans l'étude	Déjà référencées dans les bases de données UniProt ou PHOSIDA
α-tubuline	
T80, T94, T145, S151, S170, S187, T257, T349, T382	T73, T82, T150, T253, Y262, T271, S277, Y319, T334, S340 (dans l'isotype α -tubuline 1A), Y357, T361, Y399
β-tubuline	
T166, T214, T285, T372, T386	S48, T55, S75, S78, S95, S115, S126, S168, S172, T218, S234, T274, S275, T290, T312, S322, T366, S371, S382

Tableau 3 : Sites de phosphorylation identifiés dans les sous-unités α et β de la tubuline sur de la tubuline isolée de cellules HeLa (d'après Liu *et al.*, 2015).

D3b - Interactions moléculaires contrôlées par les modifications post-traductionnelles

La plupart des MPTs étudiées sont retrouvées sur la queue C-terminale des sous-unités α et β de la tubuline (cf. Figure 7). Cette extrémité est exposée à la surface des MTs assemblés et sert de site d'interaction majeur pour les MAPs (*Microtubule-Associated*

Proteins ; cf. **page 75**). De plus, la séquence de cette région C-terminale varie en fonction des isotypes de tubuline (cf. **Figure 5**). Ainsi, les modifications post-traductionnelles associées aux isotypes peuvent réguler les propriétés des MTs, directement ou indirectement, en influençant le recrutement des MAPs (**Gadadhar et al., 2017** ; cf. **page 37**).

II – Propriétés fondamentales des microtubules

Les MTs sont polarisés et dynamiques. Bien qu'ils soient capables d'une croissance et d'une décroissance rapide à leurs extrémités (**Mitchison and Kirschner, 1984a**), ils sont rigides avec des longueurs de persistance (une mesure de la rigidité d'un polymère) de l'ordre des dimensions cellulaires (**Gittes et al., 1993**).

A – La polarisation des microtubules

Un MT est dit polarisé car il possède deux extrémités distinctes. L'assemblage tête à queue des dimères d' α/β -tubuline est à l'origine de cette polarité intrinsèque du MT (cf. **Figure 2**).

Dans les cellules, comme les fibroblastes en interphase, l'extrémité (+) est orientée vers la périphérie cellulaire et l'extrémité (-) est ancrée au centre organisateur des MTs (MTOC pour *Microtubule-Organizing Center*), généralement le centrosome (cf. **page 43**), situé près du noyau (**Mitchison and Kirschner, 1984a** ; cf. **Figure 8-A**). La β -tubuline pouvant échanger son GTP est exposée au niveau de l'extrémité (+), tandis que l' α -tubuline est exposée au niveau de l'extrémité (-) (**Mitchison, 1993** ; **Nogales et al., 1999** ; cf. **Figure 2**). De plus, l'extrémité (+) est plus dynamique que l'extrémité (-) (**Howard and Hyman, 2003** ; **Jiang and Akhmanova, 2011**), qui est généralement bloquée au niveau du MTOC (cf. **Figure 8**).

Les conséquences macroscopiques majeures de la polarité microtubulaire sont le caractère symétrique ou au contraire asymétrique de la division, de la migration, ou encore l'établissement de l'architecture cellulaire dans les cellules épithéliales ou neuronales, dans lesquelles les dendrites et les axones ne possèdent pas la même polarité (**Hardin et al., 2012** ; cf. **Figure 8-B**). Cette polarité permet également aux MTs d'assurer leur fonction dans le trafic des vésicules ou organites, du fait de l'établissement de directions préférentielles pour les moteurs moléculaires (cf. **page 115**) circulant sur les MTs (**Hirose et al., 1995**).

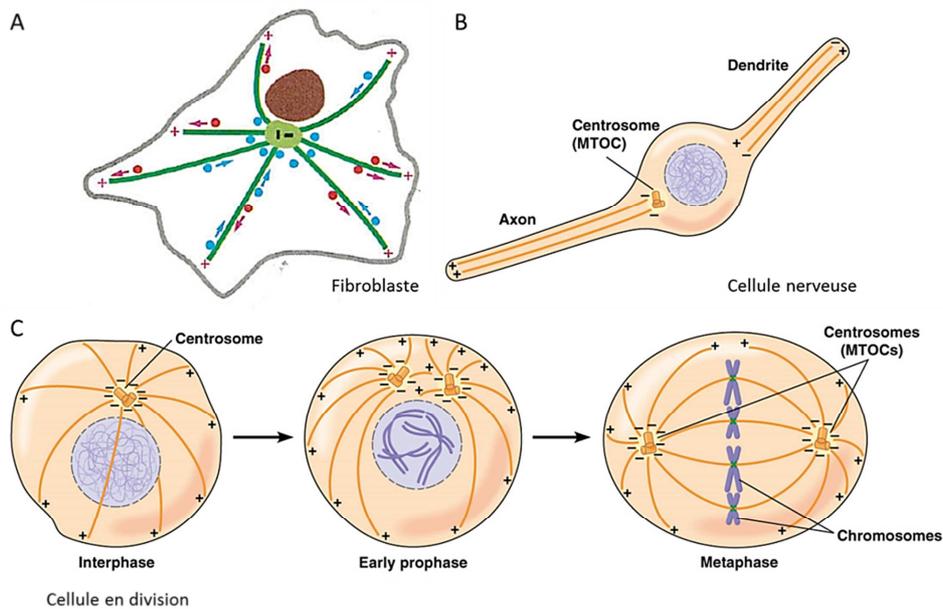


Figure 8 : Orientation des microtubules et localisation du ou des centre(s) organisateur(s) (MTOC) (A) dans un fibroblaste en interphase (d'après **Alberts et al., 2011**) (B-C) dans une cellule nerveuse et une cellule en mitose (d'après **Hardin et al., 2012**).

B – La dynamique des microtubules et sa régulation

Le réseau microtubulaire est une structure hautement dynamique. En effet, *in vitro* les dimères d' α/β -tubuline peuvent s'assembler et se désassembler aux deux extrémités du MT. L'étude du fuseau mitotique dans des cellules vivantes d'oocytes de vers (*Pectinaria gouldi*) en métaphase, a permis de mettre en évidence la dynamique de la structure (**Inoué and Sato, 1967**). Par ailleurs, dans les cellules vivantes interphasiques, les extrémités (-) sont souvent stabilisées, ou dépolymérisent, tandis que les extrémités (+) explorent continuellement l'espace cellulaire en alternant rapidement entre des phases de croissance et de décroissance (**Desai and Mitchison, 1997** ; cf. **Figure 9**). Ce comportement est appelé instabilité dynamique (cf. **page 48**) (**Mitchison and Kirschner, 1984b**).

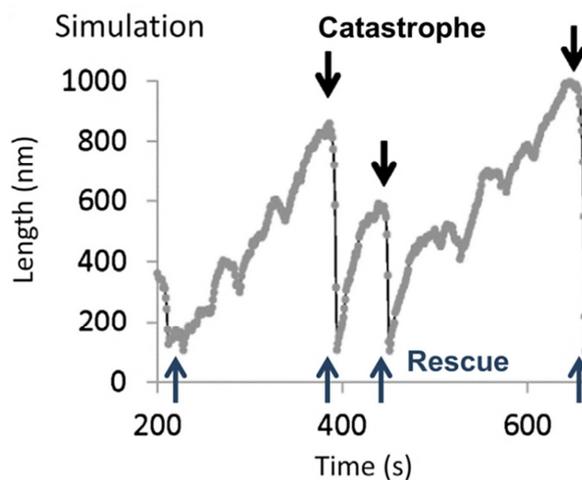


Figure 9 : L'instabilité dynamique des microtubules analysée par simulation. La polymérisation et la dépolymérisation des MTs à leur extrémité (+) sont visualisées en représentant la longueur des MTs en fonction du temps. Les transitions (sauvetage et catastrophe) sont indiquées par les flèches bleues et noires respectivement (d'après **Coombes et al., 2013**).

L'instabilité dynamique des MTs se caractérise par leurs vitesses de polymérisation et de dépolymérisation, ainsi que leurs fréquences temporelles et spatiales des transitions, qui entrecourent les cycles de polymérisation/dépolymérisation. Ces transitions sont appelées « catastrophe » lors du passage d'une phase de polymérisation ou d'une pause à une phase de dépolymérisation, et « sauvetage » lors du passage d'une phase de dépolymérisation à une phase de polymérisation ou à une pause (cf. **Figure 9**). De manière générale, les principes généraux de la dynamique des MTs sont assez bien établis, notamment concernant la nucléation, la polymérisation/dépolymérisation et les transitions (catastrophe et sauvetage).

B1 – Concentration critique, phénomène de « *treadmilling* », cycle de vie, et nucléation des microtubules

Pour promouvoir l'auto-assemblage spontané des MTs, notamment *in vitro* en absence de MAP, il faut une concentration suffisante en dimères d' α/β -tubuline (**Mitchison and Kirschner, 1984a**). La concentration de tubuline au-delà de laquelle l'assemblage des MTs l'emporte sur leur dépolymérisation est appelée concentration critique. Elle plus élevée pour l'extrémité (-) que pour l'extrémité (+) d'un MT, résultant en une polymérisation facilitée à l'extrémité (+). Plus la tubuline sera concentrée, plus les MTs pourront s'auto-assembler en un long polymère (**Hyman and Karsenti, 1998**). De plus, la vitesse d'assemblage et la longueur des MTs dépendent de la quantité totale de sous-unités de tubuline disponibles.

Si des centres de nucléation, comme des centrosomes (cf. **page 46**) purifiés sont ajoutés à une solution de tubuline de concentration inférieure à la concentration nécessaire pour une nucléation spontanée, la concentration critique résultante est abaissée. La croissance des MTs est alors transitoire et limitée par la concentration en tubuline. Si la concentration en tubuline libre est supérieure à la concentration de nucléation spontanée (soit $>$ à $\sim 20 \mu\text{M}$), un assemblage spontané des MTs coexiste avec la nucléation centrosomale, formant deux populations de MTs (**Hyman and Karsenti, 1998** ; cf. **Figure 10**).

En présence de MAPs (cf. **page 75**) en plus des centres de nucléation, *in vitro* la concentration critique est encore réduite et se situe entre 1 et 3 μM (**Hyman and Karsenti, 1998**).

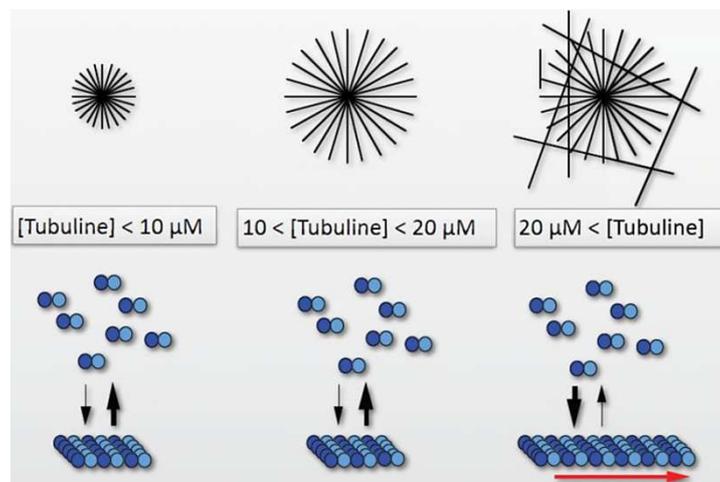


Figure 10 : Schémas mettant en relief la notion de concentration critique d' α/β -tubuline libre nécessaire lors de l'auto-assemblage des MTs, en présence de centre de nucléation (centrosome) (d'après **Hyman and Karsenti, 1998**).

La notion de « *treadmilling* » ou « tapis roulant » a initialement été découvert *in vitro* (Margolis and Wilson, 1978). Elle vient du fait qu'*in vitro* les MTs peuvent présenter à la fois une polymérisation continue à l'extrémité (+) et une dépolymérisation à l'extrémité (-), puisque la concentration critique en tubuline est plus élevée à l'extrémité (-) (Jordan and Wilson, 2004 ; Galjart, 2005 ; cf. Figure 11). Ce phénomène a été décrit pour la première fois *in vivo* sur les filaments d'actines, puis sur les MTs (Kirschner, 1980). Il a ensuite pu être mis en évidence *in vivo* sur des MTs non-centrosomaux se détachant de leurs sites de nucléation. Ces MTs donnent l'illusion de glisser vers la périphérie cellulaire, sans l'aide de moteurs moléculaires, ainsi que pendant la mitose où les extrémités (-) sont libres (Yvon and Wadworth, 1997).

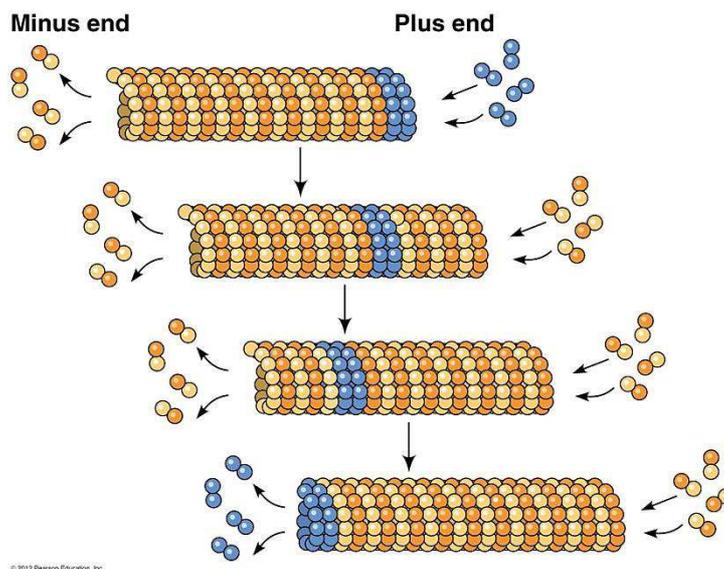


Figure 11: Phénomène de « *treadmilling* » ou « tapis roulant » des microtubules dû à la polymérisation à l'extrémité (+) et la dépolymérisation à l'extrémité (-) (Hardin *et al.*, 2012).

Grâce à des simulations, il a été montré que la dynamique microtubulaire est caractérisée par une croissance lente, une décroissance rapide, et des fréquences temporelles de catastrophe et de sauvetage respectivement faible et élevée (Coombes *et al.*, 2013 ; cf. Figure 9). Ainsi, une caractéristique principale de la vie cellulaire du MT est le caractère asymétrique des phases de polymérisation et de dépolymérisation, ainsi que des fréquences de transition. Peu après leur naissance, les MTs croissent de façon continue avec une faible fréquence de catastrophes, du MTOC à la périphérie cellulaire (Komarova *et al.*, 2002a ; Kollman *et al.*, 2011 ; Brouhard, 2015 ; cf. Figure 9). En périphérie cellulaire, les MTs alternent ensuite entre des phases de polymérisation et de dépolymérisation (phénomène d'instabilité dynamique, cf. Figure 9). Après chaque catastrophe, les MTs dépolymérisent seulement sur une courte distance, et non pas sur leur longueur totale (Coombes *et al.*, 2013). Grâce à une fréquence de sauvetages élevée (Hyman and Karsenti, 1998 ; Brouhard, 2015), les extrémités (+) se concentrent majoritairement à la périphérie cellulaire et y passent l'essentiel de leur vie (Komarova *et al.*, 2002a). Le cycle de vie des MTs comporte donc plusieurs phases qui sont reproduites *in vitro* : d'abord la nucléation, puis l'élongation et enfin un plateau pendant lequel opère l'instabilité dynamique (cf. Figure 12). *In vivo*, le plateau au niveau des extrémités (+) des MTs peut correspondre à une stabilisation prolongée,

notamment en présence de cargaisons. Dans tous les cas, le cycle de vie se termine par une dépolymérisation complète.

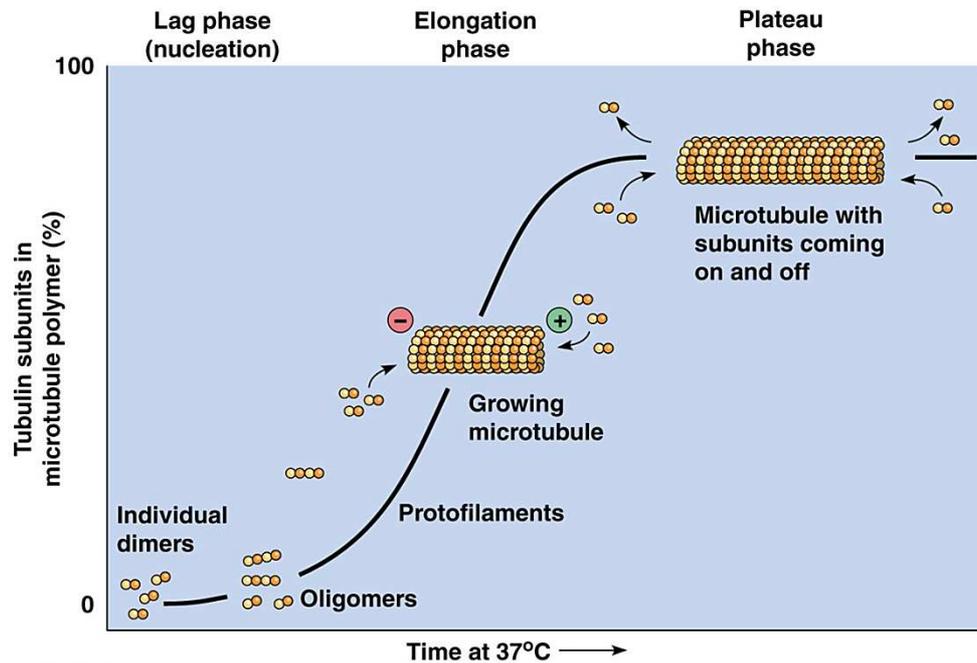


Figure 12 : Cycle de vie des microtubules *in vitro*. Représentation des trois phases successives au cours du temps: la nucléation, l'élongation et la stabilisation (Hardin *et al.*, 2012).

La nucléation des MTs arrive spontanément *in vitro*, mais dans des conditions physiologiques (où la concentration en dimères d' α/β -tubuline est sub-critique), ce processus nécessite des facteurs de nucléation, qui miment et stabilisent une petite amorce de microtubules formée de multiples hétérodimères d' α - et β -tubulines, dans le but d'initier la polymérisation (Teixidó-Travesa *et al.*, 2012 ; Sulimenko *et al.*, 2017 ; Roostalu and Surrey, 2017 ; cf. Figure 13).

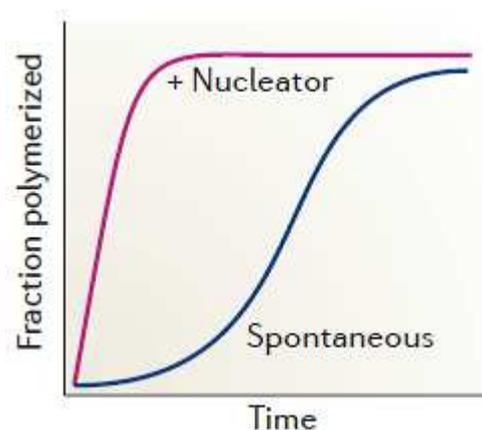


Figure 13 : Impact d'un centre de nucléation sur la rapidité de polymérisation des microtubules, en passant plus vite la phase de nucléation, qui est observable pendant l'assemblage spontané des microtubules (Kollman *et al.*, 2011 ; Roostalu and Surrey, 2017).

La nucléation des MTs est opérée par les MTOCs (Lüders and Stearns, 2007 ; cf. Figures 8 et 14). Un facteur de nucléation majeur est la γ -tubuline, qui est présente dans tous

les MTOCs. Ces derniers empêchent le plus souvent les dépolymérisations de l'extrémité (-), limitant l'instabilité dynamique à cette extrémité (Galjart, 2005). Par conséquent, l'extrémité (+) des MTs est dirigée loin du MTOC et peut interagir avec le cortex cellulaire (Howard and Hyman, 2003). Les MTOCs canoniques sont les SPBs (*Spindle Pole Bodies*) chez la levure et les centrosomes, chez les eucaryotes supérieurs (Teixidó-Travesa *et al.*, 2012 ; Sulimenko *et al.*, 2017). Le centrosome, est une petite structure constituée d'une paire centrale de centrioles entourée de matériel péri-centriolaire qui entoure la γ -tubuline (Bornens, 2012 ; Sulimenko *et al.*, 2017 ; cf. Figures 14 et 15). Cette tubuline est hautement conservée et est concentrée sous forme d'un anneau spiralé où elle sert de matrice pour la nucléation et la polymérisation des MTs (Oakley and Oakley, 1989 ; cf. Figure 14). Avec d'autres protéines, appelées GRIPs (γ Tubulin Ring Proteins) ou GCPs (γ Tubulin Complex Proteins ; aussi connues sous le nom de TUBGCPs chez les humains), elle fait partie du complexe γ -TURC (γ Tubulin Ring Complex) (Sulimenko *et al.*, 2017 ; Roostalu and Surrey, 2017 ; cf. Figure 14-C). Ce complexe est composé de treize molécules de γ -tubuline s'associant chacune à un dimère d' α - et de β -tubulines. Il permet donc de nucléer des microtubules de treize protofilaments (Kollman *et al.*, 2010). *In vivo*, les complexes protéiques de γ -tubuline permettent un contrôle spatio-temporel de la croissance de nouveaux MTs (Teixidó-Travesa *et al.*, 2012). En plus de la nucléation, ce complexe est aussi impliqué dans la stabilisation des MTs, en capturant leurs extrémités (-) (Anders and Sawin, 2011), mais aussi de façon plus surprenante, dans la modulation de la dynamique des extrémités (+) des MTs en limitant les catastrophes (Bouissou *et al.*, 2009).

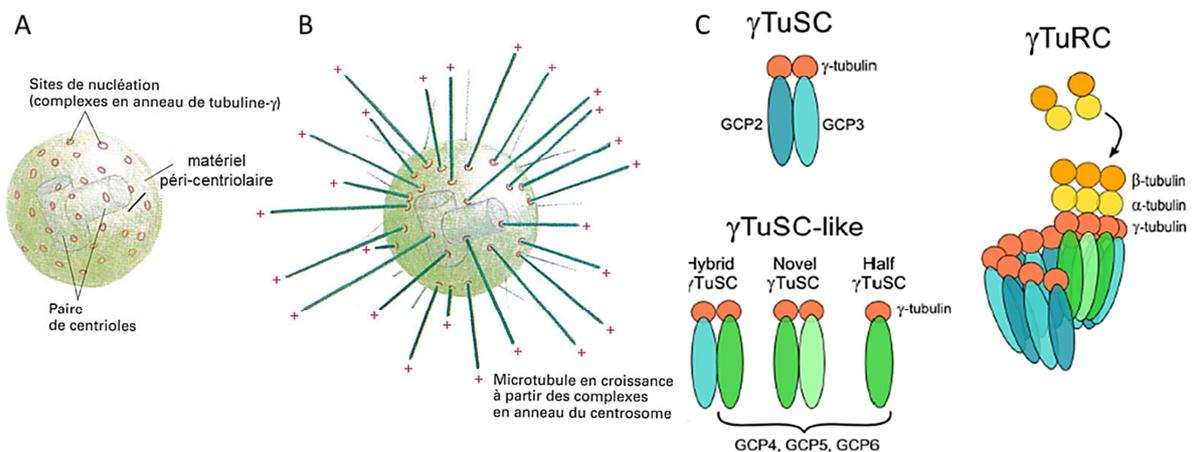


Figure 14 : La nucléation centrosomale. (A-B) Schémas du centrosome avec les deux centrioles et les anneaux de γ -tubuline dans le matériel péri-centriolaire (d'après Alberts *et al.*, 2011). (C) Composition du complexe γ -TURC et modèle d'assemblage des microtubules composés de treize protofilaments (Sulimenko *et al.*, 2017).

Cependant *in vivo*, la nucléation des MTs peut aussi avoir lieu en dehors du centrosome (nucléation extra-centrosomale) (cf. Figure 15). Plusieurs travaux ont montré que ces structures cellulaires spécifiques peuvent capturer les MTs et réguler leur croissance et leur dynamique (Kirschner and Mitchison, 1984a ; Kirschner and Mitchison, 1984b ; Sanders and Kaverina, 2015 ; Sánchez-Huertas *et al.*, 2016).

Le premier MTOC non-centrosomal décrit est l'enveloppe nucléaire dans les myocytes cardiaques en interphase (Kronebusch and Singer, 1987). Puis, plusieurs MTOCs extra-

centrosomaux ont été décrits chez les plantes (Lüders and Stearns, 2007) et dans différents organismes. Certains d'entre eux apparaissent spécifiques de certains types cellulaires (Petry and Vale, 2015). Par exemple, pendant l'interphase, les MTs peuvent être nucléés par l'appareil de Golgi (Chabin-Brion *et al.*, 2001 ; Zhu and Kaverina, 2013 ; Sanders and Kaverina, 2015 ; cf. Figure 15), par l'enveloppe nucléaire, les kinétochores, la chromatine (Petry and Vale, 2015), ou encore par des sites associés à la membrane plasmique et les adhérences focales, ainsi qu'à la surface d'autres MTs préexistants (Bouissou *et al.*, 2009 ; Sulimenko *et al.*, 2017 ; cf. Figure 15). Dans tous les cas, ces complexes de nucléation contiennent le γ TURC et des protéines associées spécifiques, adaptées suivant la localisation du centre de nucléation (Petry and Vale, 2015). Ces sites de nucléation non-centrosomaux jouent un rôle important dans la création et le maintien de l'architecture cellulaire (Lin *et al.*, 2015 ; Petry and Vale, 2015). Par exemple, le complexe augmin- γ TURC, initialement identifié dans les cellules mitotiques, peut aussi être utilisé pour contrôler la polarité des MTs (Sánchez-Huertas *et al.*, 2016).

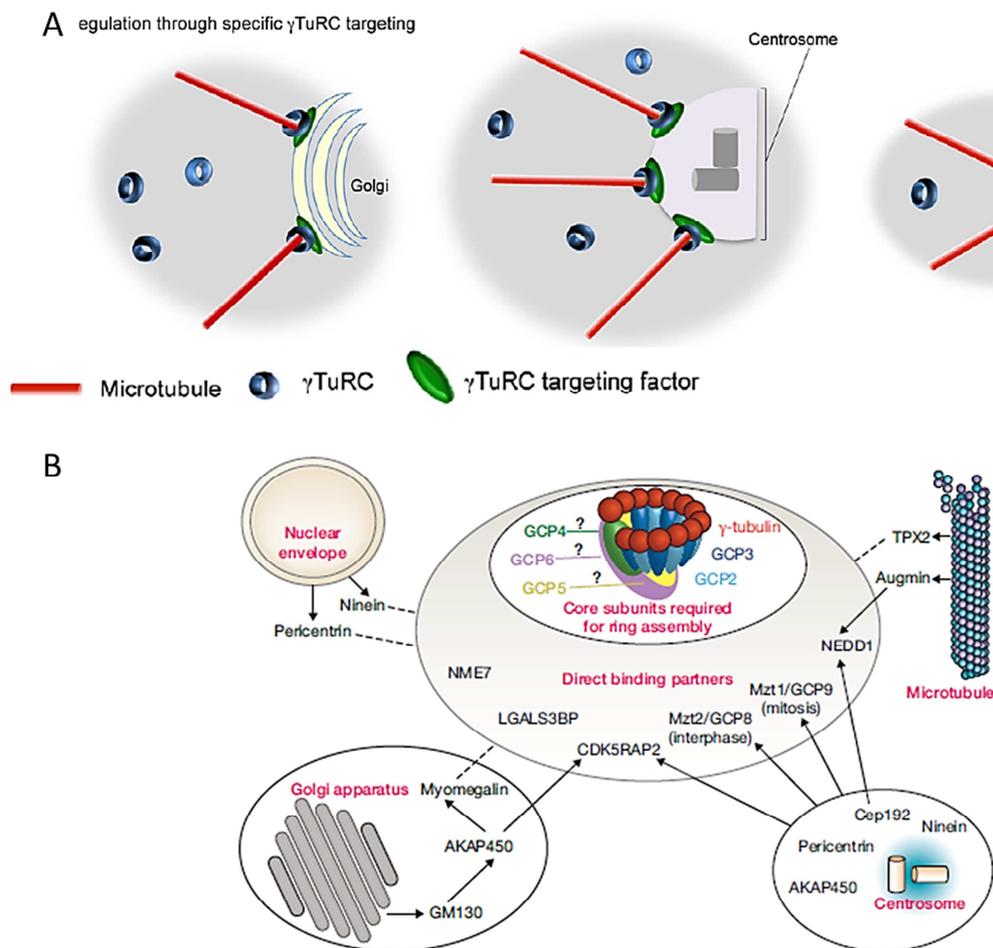


Figure 15 : La nucléation extra-centrosomale. (A) Centres de nucléation (MTOCs) localisés au niveau de l'appareil de Golgi ou d'un microtubule déjà préformé. La nucléation centrosomale est aussi représentée au centre (d'après Teixidó-Travesa *et al.*, 2012). (B) Complexes de nucléation en dehors du centrosome recrutant le γ TURC et différentes protéines adaptatrices. Les protéines associées au centrosome sont aussi indiquées, en bas à droite (Petry and Vale, 2015).

B2 – Instabilité dynamique

La notion d'instabilité dynamique remonte à 1984. Les extrémités des MTs alternent continuellement entre des phases de polymérisation lentes et des phases de dépolymérisation rapides (cf. **Figure 9**). Ces allongements et raccourcissements se font de manière indépendante entre les deux extrémités et les différents MTs adjacents. Ce comportement a initialement été décrit *in vitro* (**Mitchison and Kirschner, 1984b** ; cf. **Figure 9**). La vitesse de polymérisation dépend de la concentration en tubuline soluble, tandis que la vitesse de dépolymérisation est indépendante de la concentration en tubuline (**Walker et al., 1988**). Concernant les transitions, les fréquences de sauvetage et de catastrophe sont respectivement proportionnelles et inversement proportionnelles à la concentration en tubuline (**Walker et al., 1988**).

Dans les cellules, ce comportement dynamique permet aux extrémités (+) des MTs d'explorer continuellement le cytoplasme. Cela leur permet de réaliser des interactions avec des partenaires, qui diffusent mal dans l'espace cellulaire, comme les organites membranaires, les chromosomes et les cargaisons vésiculaires (**Desai and Mitchison, 1997**). Ainsi, l'extrémité (+) d'un MT est souvent la première partie que rencontre une cargaison quand le microtubule explore le cytoplasme. La plupart des régulateurs de l'instabilité dynamique, ainsi que les médiateurs des interactions entre les cargaisons et les MTs, sont localisés au niveau des extrémités (+) (**Folker et al., 2005**).

En plus des paramètres de la dynamique des MTs (vitesses de polymérisation/dépolymérisation et fréquences de catastrophe et sauvetage), les MTs sont également caractérisés par la durée, ainsi que les fréquences temporelles et spatiales des pauses. Quand les pauses se prolongent, les MTs sont dits stables (**Walker et al., 1988** ; **Desai and Mitchison, 1997** ; cf. **Figure 9**). Ainsi, dans les cellules, deux sous-populations de microtubules coexistent : les MTs dits stables et les MTs dits dynamiques. *In vivo*, les MTs stables présentent une longévité plus grande et sont protégés contre la déstabilisation. Ils peuvent également avoir une coiffe de tubuline-GTP. Un MT capturé par un centre de nucléation peut devenir stable. Cette stabilité des MTs est importante pour la grande longévité des MTs impliqués dans le mouvement de cargaisons (**Brouhard and Rice, 2014**).

L'instabilité dynamique du MT peut être complètement reconstituée *in vitro*, uniquement en associant la tubuline avec des protéines recombinantes, appelées MAPs (cf. **page 75**) (**Kinoshita et al., 2001** ; **Li et al., 2012** ; **Zanic et al., 2013**). Initialement, les combinaisons et les concentrations de ces protéines ne reproduisaient pas complètement la dynamique des MTs retrouvées *in vivo*. La dynamique d'assemblage/désassemblage était plus élevée dans les cellules qu'*in vitro* (**Kinoshita et al., 2001**) et les événements de sauvetage et de pause survenaient à des taux plus faibles que dans les cellules (**Li et al., 2012**). Ces différences sont dues au fait que dans les systèmes minimalistes de levure *in vitro*, il manquait des facteurs, comme le facteur de sauvetage CLASP montré chez la levure (**Al-Bassam et al., 2010** ; cf. **page 98**). Récemment, il a été montré qu'en associant la tubuline libre avec cinq protéines purifiées à partir de cellules S2 de drosophile (EB1, XMAP215^{MspS}, Sentin, Kinesin-13^{Klp10A} et CLASP^{Mast/Orbit} ; cf. **pages 90, 95, 110, 121 et 98**), la dynamique des MTs reproduit qualitativement et dans une certaine mesure, quantitativement celle observée *in vivo* (**Moriwaki and Goshima, 2016** ; cf. **Figure 16**).

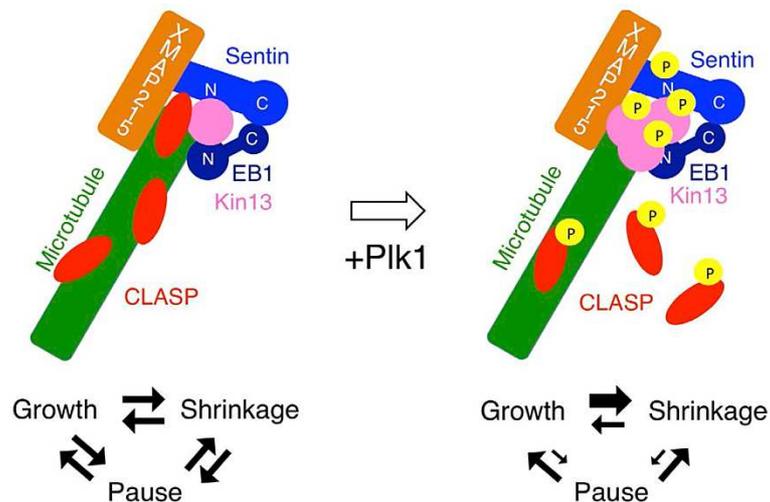


Figure 16 : Reconstitution *in vitro* du comportement dynamique de l'extrémité (+) du microtubule. Les trois phases du cycle de polymérisation sont observés en ajoutant à de la tubuline purifiée (en vert) cinq MAPs recombinantes : Kin13 (en rose), EB1 (en bleu foncé), Sentin (en bleu), XMAP215 (en orange) et CLASP (en rouge). L'addition de la protéine kinase Plk1 active, augmente la dynamique des MTs, en diminuant les événements de pause (d'après **Moriwaki and Goshima, 2016**).

L'instabilité dynamique des extrémités (+) des MTs est majoritairement alimentée par l'hydrolyse du GTP associé à la tubuline (**Hyman et al., 1992** ; cf. **Figure 3**). En effet, l'assemblage des MTs consomme de l'énergie qui provient de l'hydrolyse du GTP (**Kononova et al., 2015**). Du fait des fluctuations dans l'hydrolyse du GTP, la coiffe de tubuline-GTP peut disparaître exposant la tubuline-GDP à l'extrémité (+) et engendrant la catastrophe du MT (**Mitchison and Kirschner, 1984a**). Au laboratoire, un anticorps recombinant (hMB11) spécifique de la conformation où la tubuline lie le GTP dans le polymère, a pu être purifié (**Dimitriov et al., 2008**). L'utilisation de cet anticorps a permis de mettre en évidence des zones enrichies en tubuline-GTP dans les MTs cellulaires (cf. **Figure 17**). Ces zones ne sont pas retrouvées seulement à l'extrémité (+) de chaque microtubule en croissance, mais aussi le long du corps des MTs en des points discrets, appelés îlots, qui sont des sites potentiels de sauvetage (**Dimitrov et al., 2008** ; **De Forges et al., 2013**). Les îlots GTP ne sont pas distribués de façon aléatoire le long des MTs. Ils apparaissent préférentiellement aux croisements microtubulaires et correspondent à des défauts architecturaux de la paroi microtubulaire (**De Forges et al., 2016**). Il est important de noter que la protéine de sauvetage CLIP-170 (cf. **page 138**), reconnaît ces îlots de tubuline-GTP dans le corps des MTs (**De Forges et al., 2016**). Dans le but de déterminer si les îlots de tubuline-GTP peuvent être à l'origine d'événements de sauvetage, des chercheurs ont généré des îlots de tubuline-GMPCPP (analogue du GTP lentement hydrolysable) *in vitro*. Ils rapportent que ces îlots semblent induire des événements de sauvetage, avec une fréquence de sauvetage directement corrélée avec la taille et la proportion de molécules de tubuline-GMPCPP de l'îlot (**Tropini et al., 2012**).

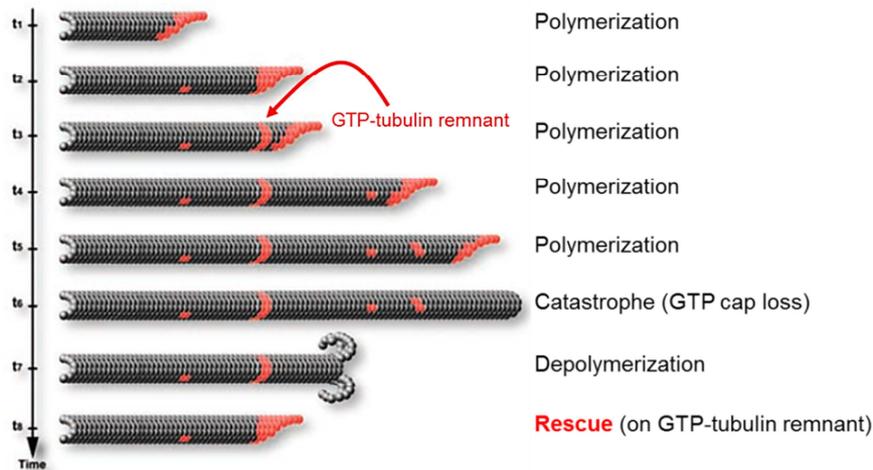


Figure 17 : Importance de la tubuline GTP dans la dynamique des microtubules. Modèle montrant les zones riches en tubuline-GTP (en rouge) à l'extrémité (+) et à l'intérieur du microtubule (îlots qui peuvent être des sites de sauvetage) (d'après **Dimitrov et al., 2008**).

Nous avons vu précédemment qu'un événement de sauvetage des MTs correspond au processus durant lequel la dépolymérisation soudaine et stochastique est convertie en polymérisation (**Brouhard, 2015**). Il a été montré que les sauvetages jouent un rôle important dans le cycle de vie des MTs. En effet, ils maintiennent la longueur des MTs en les stabilisant, ainsi que l'ancrage de ces derniers au cortex cellulaire, notamment pour assurer le positionnement du fuseau mitotique et la polarité cellulaire (**Laan et al., 2012 ; Hendricks et al., 2012 ; Gardner et al., 2013**). Les sauvetages des MTs ancrés aux kinétochores contribuent probablement à l'oscillation des chromosomes qui est importante pour leur ségrégation pendant la mitose (**Stumpff et al., 2012**). Les sauvetages sont corrélés *in vitro* avec la concentration en tubuline (**Walker et al., 1988**), néanmoins, ils nécessitent *in vivo* l'intervention de protéines stimulatrices (**Brouhard, 2015**). Les trois protéines majeures de sauvetage sont CLIP-170 (**Perez et al., 1999 ; Komarova et al., 2002a ; cf. page 138**), ainsi que son paralogue, CLIP-115 (**De Zeeuw et al., 1997 ; Komarova et al., 2002a ; cf. page 138**) et les protéines associées CLASPs (**Mimori-Kiyosue et al., 2005 ; Al-Bassam et al., 2010 ; cf. page 98**).

Par ailleurs, d'autres facteurs promoteurs indirects de sauvetage ont été identifiées, comme la protéine pVHL (*tumor suppressor Von Hippel-Lindau protein*) qui augmenterait le nombre d'îlots tubuline-GTP dans les MTs (**Thoma et al., 2010**), renforçant l'idée supportée par **Dimitrov et al., (2008)** que les îlots tubuline-GTP peuvent induire des événements de sauvetage dans les cellules. Il a aussi été montré que les cellules déplétées en isotype β -tubulineIV ont une fréquence de sauvetage augmentée, qui est corrélée à une augmentation des régions riches en tubuline-GTP dans les MTs (**Bhattacharya et al., 2011**). Le γ TURC peut également promouvoir les sauvetages, en raison de sa localisation ponctiforme le long des MTs en interphase et avec des sites des événements de pause ou de sauvetage (**Bouissou et al., 2009**). D'autres données indiquent qu'une source majeure favorisant les événements de sauvetage est la tension mécanique fournie par la dynéine corticale au niveau des extrémités (+) des MTs, lors du positionnement du fuseau mitotique dans les embryons de *C. elegans* (**Laan et al., 2012**).

En ce qui concerne les événements de catastrophe, correspondant au passage d'une polymérisation à une dépolymérisation rapide, ils régulent la longueur des MTs cellulaires (**Gardner *et al.*, 2013**), qui sont corrélés au vieillissement des MTs. En d'autres termes, les MTs plus âgés sont plus susceptibles de faire une catastrophe que les MTs plus jeunes (**Gardner *et al.*, 2011** ; cf. **Figure 18**), probablement parce qu'ils accumulent des défauts pendant leur croissance (**Bowne-Anderson *et al.*, 2013**), ou du fait d'un effilage accru de leurs extrémités (**Coombes *et al.*, 2013**). Ainsi, la fréquence de catastrophe n'est pas une constante, mais elle augmente avec l'âge et la longueur du MT (**Gardner *et al.*, 2011** ; **Gardner *et al.*, 2013**), ainsi que la réduction de la coiffe GTP (**Dimitrov *et al.*, 2008** ; cf. **Figures 17 et 18**). De ce fait, un événement de catastrophe est vu comme un processus multi-étapes nécessitant plusieurs éléments indépendants et aléatoires qui s'accumulent au cours de la polymérisation (**Gardner *et al.*, 2013**). Ce modèle multi-étapes prédit une réduction du nombre des événements de catastrophes près des centres de nucléation, observée par rapport à la périphérie cellulaire (**Komarova *et al.*, 2002b**). De plus, le processus de vieillissement des MTs peut être globalement et localement modifié par des facteurs extrinsèques, comme différentes protéines associées aux MTs, telle que la dépolymérase MCAK (cf. **page 121**) et/ou une force mécanique dans le contexte de l'environnement cellulaire (**Gardner *et al.*, 2013**).

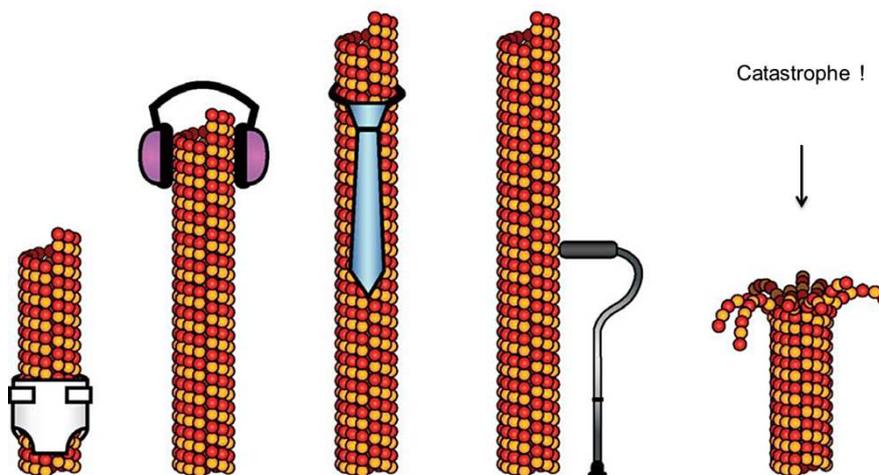


Figure 18 : Processus de vieillissement des MTs conduisant à un événement de catastrophe. De gauche à droite, sont représentés un microtubule très jeune, adolescent, adulte, puis âgé avant un événement de catastrophe (**Brouhard, 2015**).

III – Fonctions des microtubules

Les fonctions des MTs sont largement étudiées et la plupart sont rendues possibles par leurs deux propriétés fondamentales, leur polarité intrinsèque et leur dynamique (**Choi *et al.*, 2002**). Les MTs sont ainsi impliqués dans divers mécanismes cellulaires, tels que le trafic intracellulaire, le maintien de l'architecture, la polarité, la migration, la différenciation ou encore la division, la survie et la mort des cellules (**Akhmanova and Steinmetz, 2015** ; **Liu**

et al., 2015 ; Bowne-Anderson et al., 2015). Les MTs sont également des composés essentiels de structures plus stables comme les cils primaires et les flagelles/cils motiles (*Akhmanova and Steinmetz, 2015 ; Bown-Anderson et al., 2015 ; cf. Figure 20*). Un des rôles principaux des MTs est d'assurer le trafic intracellulaire de cargaisons, vésicules, macromolécules (protéines, ARNm), particules virales et organites (cf. *Figure 19-F, G*). Ainsi, ils déterminent la position des organites membranaires et dirigent leur transport intracellulaire (*Akhmanova and Steinmetz, 2015 ; Liu et al., 2015*). Par exemple, ces rôles pléiotropes des MTs sont mis en évidence pendant la vie des cellules neuronales (cf. *Figure 19*).

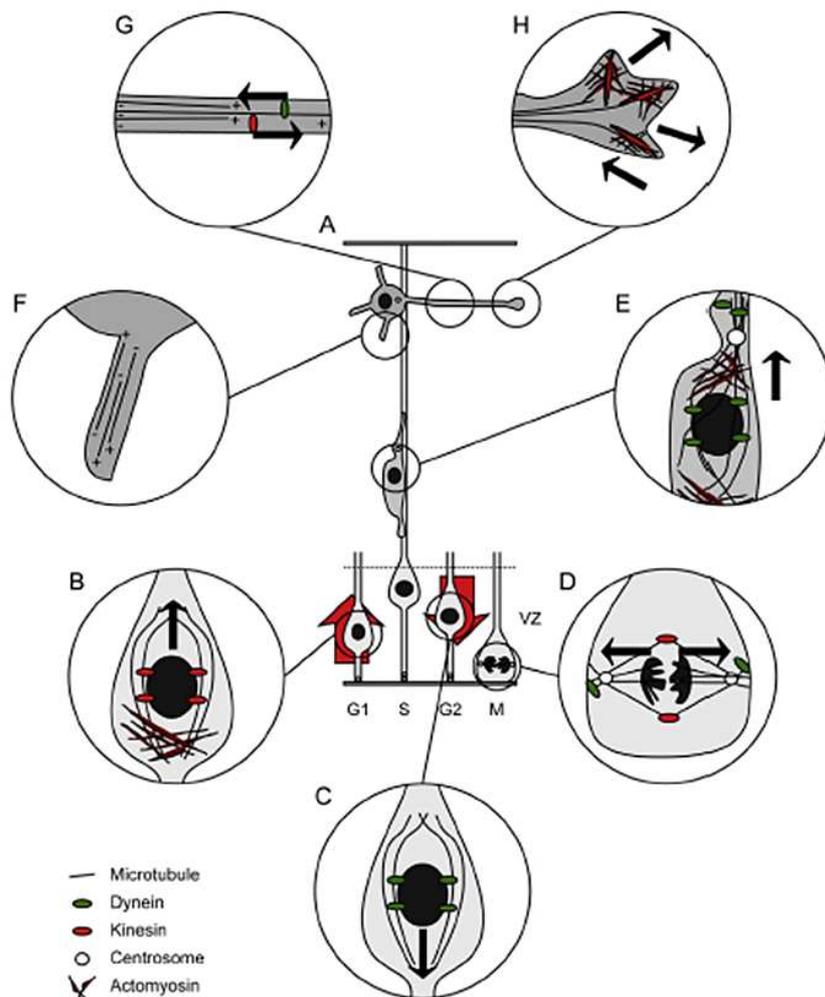


Figure 19 : Fonctions des microtubules pendant le neuro-développement. Les microtubules sont impliqués dans la différenciation des neurones (**A**), le transport du noyau vers le pôle basal par la kinésine (**B**) ou le pôle apical par la dynéine (**C**). Ils assurent aussi la séparation des chromatides sœurs pendant la division cellulaire (**D**) et la migration neuronale (**A** et **E**), ainsi que le transport axonal et dendritique régulé par la polarité microtubulaire (**F** et **G**). Ils participent aussi au fonctionnement des cônes de croissance, en fortifiant les filopodes et lamellipodes (**H**) (d'après *Breuss et al., 2017*).

Les MTs jouent aussi un rôle très important dans la division cellulaire. Effectivement, pendant la division cellulaire, les MTs constituent le fuseau mitotique (cf. *Figures 19-D et 20*), soit la structure nécessaire pour séparer les chromatides répliqués dans les cellules filles, via la génération de la force mécanique nécessaire (*Kononova et al., 2015*). Ils ont aussi un

rôle majeur dans le trafic des constituants des différentes voies de signalisation cellulaire (**Gundersen and Cook, 1999 ; Muroyama and Lechler, 2017**) et dans l'apoptose, où ils sont réorganisés en un réseau cortical essentiel pour maintenir l'intégrité de la membrane plasmique (**Oropesa Ávila et al., 2015**). Lors de l'apoptose, les MTs semblent servir de structure de séquestration à des protéines modulant le programme apoptotique intracellulaire, telles qu'une protéine de la famille de Bcl-2, Bim (*Bcl-2 interacting mediator of cell death*) et la survivine (**Oropesa Ávila et al., 2015**). Ils participent aussi à l'autophagie, en contribuant à la formation et au transport des autophagosomes en amont de la formation des autolysosomes (**Mackeh et al., 2013**). L'autophagie signifie « se manger soi-même » et assure la dégradation de constituants cellulaires grâce aux lysosomes, afin de maintenir l'homéostasie cellulaire. Par conséquent, chez les eucaryotes, des dérégulations de ces fonctions pléiotropes des MTs sont à l'origine de maladies (**Akhmanova and Steinmetz, 2015**).

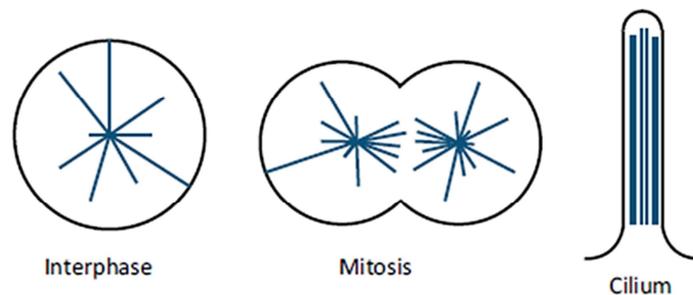


Figure 20 : Organisation et implication des microtubules dans l'architecture cellulaire. Les microtubules (en bleu) forment une structure radiale dans les cellules en interphase, un fuseau mitotique bipolaire dans les cellules en mitoses et l'axonème linéaire dans les cils (**Bown-Anderson, 2015**).

A – Polarité et migration cellulaire

La polarité cellulaire résulte en une organisation asymétrique des composants et des structures avec une réorganisation du cytosquelette (**Li and Gundersen, 2008**). Les MTs apportent les bases structurales de la polarité cellulaire du fait de leur structure intrinsèquement polarisée. Leur caractère dynamique leur permet de répondre rapidement aux signaux d'établissement de la polarité (**Li and Gundersen, 2008**). Les cellules épithéliales différenciées sont l'archétype de la polarité apico-basale (**Nakano and Takashima, 2012 ; Toya et al., 2016 ; Gandalvočová et al., 2016**). Ces cellules possèdent un réseau microtubulaire caractéristique, orienté le long de l'axe apico-basal, reflétant l'asymétrie de leur surface cellulaire. En d'autres termes, les extrémités (-) des MTs sont ancrées au cortex apical ou pôle apical, tandis que les extrémités (+) sont dirigées vers le pôle basal (**Toya et al., 2016 ; cf. Figure 21**).

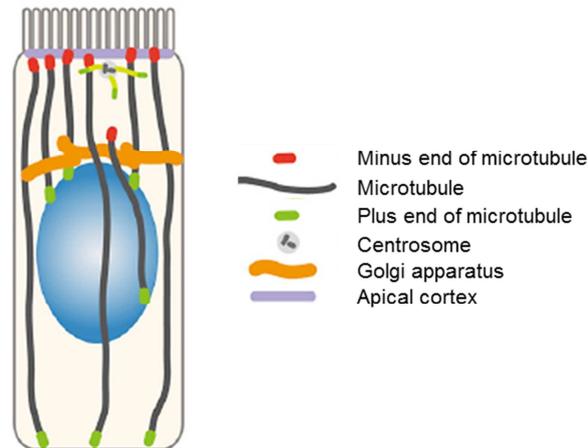


Figure 21 : Polarité apico-basale. Organisation des microtubules et des organites dans des cellules épithéliales polarisées de l'intestin. Les extrémités (-) des microtubules sont ancrées au cortex apical, tandis que les extrémités (+) sont dirigées vers le pôle basal (d'après **Toya et al., 2016**).

La polarité apico-basale épithéliale (cf. **Figure 21**), neuronale et migratoire est contrôlée par un ensemble de complexes communs, tels que Par, Scribble et Crumbs, mais aussi les phosphoinositides et les petites GTPases de la famille Rho (Rac, Rho et Cdc42) (**Gandalvočová et al., 2016** ; cf. **Figure 22**).

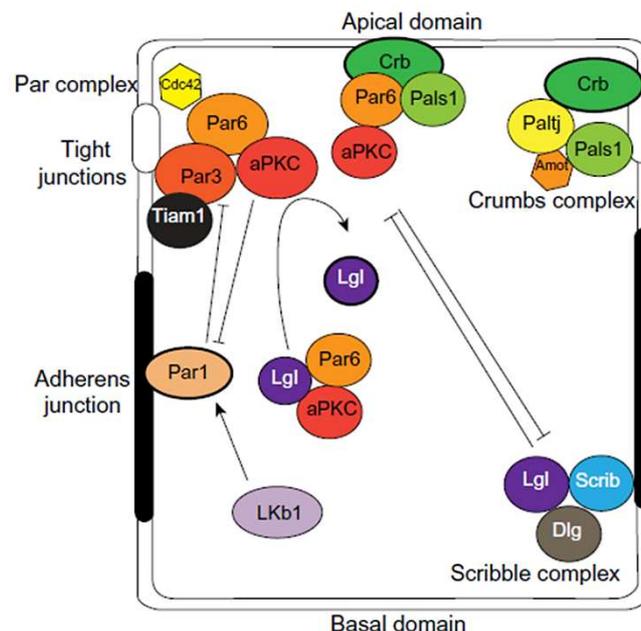


Figure 22 : Complexes de la polarité apico-basale dans les cellules épithéliales. La localisation des complexes Crumbs, Par et Scribble détermine les pôles apical et basal. Ces complexes sont interconnectés. (aPKC : *atypical Protein Kinase C*, Cdc42 : *Cell division control protein 42*, Crb : *Crumbs 3*, Dlg : *Dics-large*, Lgl : *Lethal giant larvae*, LKb1 : *Liver Kinase b 1*, Patj : *Pals-associated tight junction protein*, Scrib : *Scribble*) (**Chatterjee and McCaffrey, 2014**).

Les cellules présentes dans un épithélium différencié ont aussi une polarité planaire ou proximo-distale, avec les extrémités (+) des MTs orientées vers le complexe Fz-Dsh (Frizzled-Dshevelled) distal, tandis que les extrémités (-) sont dirigés du côté Vang-Pk (Van Gogh-Prickle) proximal (**Gandalvočová et al., 2016** ; **Butler and Wallingford, 2017** ; cf. **Figure 23-A et B**). Par ailleurs, dans les cellules nerveuses, il a été montré que les MTs sont

indispensables à la polarité des axones et dendrites. Dans ces dernières les microtubules ont une polarité différente entre l'axone, où les extrémités (+) sont orientées vers les cônes de croissance, et les dendrites présentant une polarité mixte (cf. **Figures 8-B**). Cette organisation est *in fine* essentielle à la transmission synaptique (**Marchisella et al., 2016** ; cf. **Figure 36**).

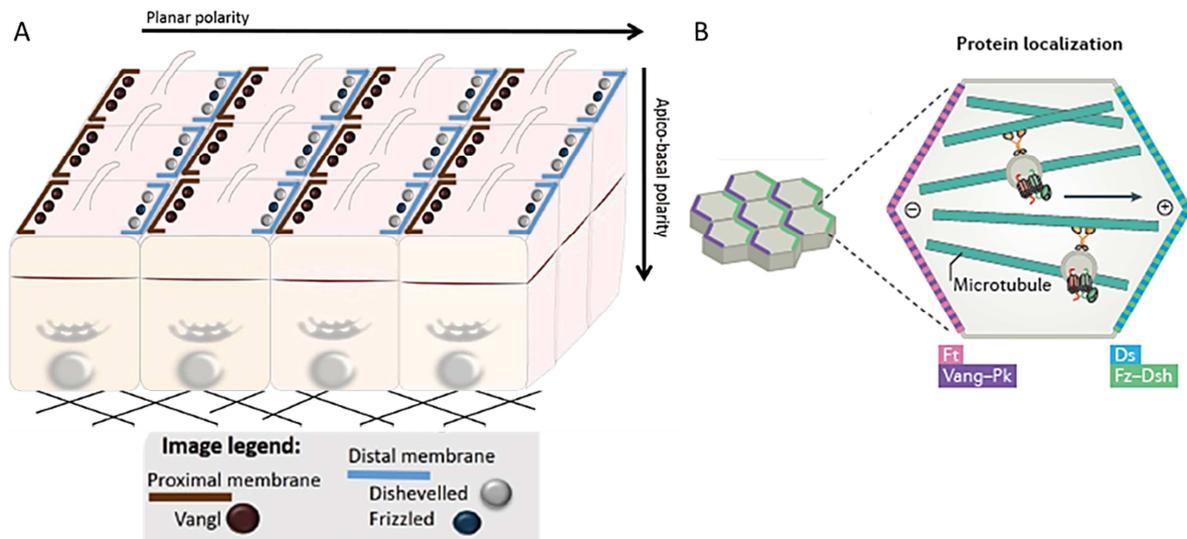


Figure 23 : Polarité cellulaire. (A) Cellules épithéliales organisées dans un épithélium multicellulaire sont polarisées verticalement selon l'axe apico-basal et horizontalement selon l'axe proximo-distal (polarité planaire). La polarité planaire est établie par une localisation asymétrique des protéines Vangl, Dishevelled et Frizzled le long des membranes proximales et distales (**Gandalvočová et al., 2016**). (B) Organisation des protéines impliquées dans la polarité planaire chez la drosophile. Les extrémités (+) des microtubules sont orientées vers les membranes contenant le complexe Frizzled(Fz)-Dishevelled(Dsh) (d'après **Butler and Wallingford, 2017**).

Lors de la migration cellulaire, le réseau microtubulaire et l'organisation des organites intracellulaires sont modifiés. En effet, le noyau se retrouve derrière le MTOC, qui est dirigé vers le front de migration, au niveau duquel les MTs sont plus stables. Les MTs stables sont acétylés et détyrosinés. Ils sont orientés vers le sens de migration et participent à la migration cellulaire (**Li and Gundersen, 2008** ; **Hernandez and Tirnauer, 2010** ; **De Forges et al., 2012** ; cf. **Figure 24**). Il a été décrit que la surexpression de la tubuline déacétylase, HDAC6 (*Histone Deacetylase 6*) favorise la migration cellulaire, en induisant des changements du degré d'acétylation de la tubuline (**Hubbert et al., 2002**). Après une blessure, les fibroblastes migrent le long de la blessure et leurs MTs stables s'orientent vers cette dernière, afin d'assurer le transport de composants cellulaires particuliers au front de migration (**Palazzo et al., 2003** ; cf. **Figure 24**).

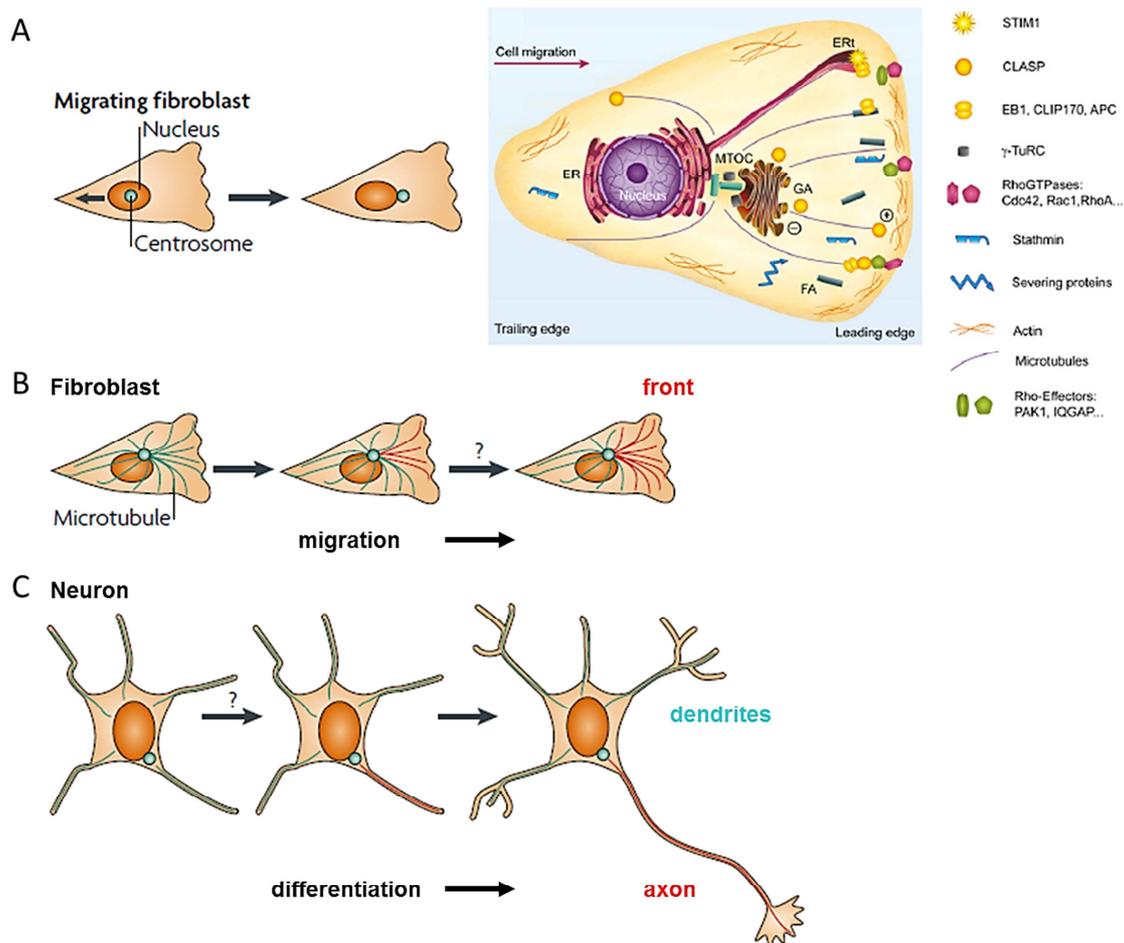


Figure 24 : Réseaux microtubulaires dans les cellules en migration et les neurones. (A) Dans un fibroblaste en migration, le MTOC (centrosome) est orienté vers le front de migration au niveau duquel les microtubules stables interagissent avec les adhérences focales (FAs) et les filaments d'actine (d'après **Li and Gundersen, 2008** ; **De Forges et al., 2012**). (B) Dans un fibroblaste en migration, les microtubules stables (en rouge) sont orientés vers la périphérie cellulaire, tandis que les microtubules dynamiques (en bleu) explorent le reste du cytoplasme (d'après **Li and Gundersen, 2008**). (C) Le même type de sous-population de microtubules est retrouvé dans un neurone différencié, avec les microtubules stables (en rouge) dans les axones et les microtubules dynamiques (en bleu) dans les dendrites (d'après **Li and Gundersen, 2008**).

Des kinases régulatrices des MTs sont impliquées dans la régulation de la polarité cellulaire. En effet, LKB1 (*Liver Kinase B1*) et l'AMPK (*AMP-activated Protein Kinase*), mais aussi GSK3 (*Glycogen Synthase Kinase*) sont nécessaires pour l'établissement et le maintien de la polarité dans différents types cellulaires, en phosphorylant des protéines associées aux MTs (MAPs ; cf. **page 75**) (**Lizcano et al., 2004** ; **Kim and Kimmel, 2006** ; **Nakano et al., 2010** ; **Amato et al., 2011** ; **Nakano and Takashima, 2012**). Dans les neurones, l'AMPK a également été montrée comme étant nécessaire à l'établissement de la croissance des neurites et leur différenciation en axones (**Amato et al., 2011**). Concernant GSK3, il a été décrit que Par6 peut s'associer à aPKC ζ pour induire la phosphorylation et l'inhibition de GSK3 β qui est nécessaire pour établir et maintenir la polarité neuronale. Cette régulation ne passe pas forcément par Cdc42 (**Kim and Kimmel, 2006**). Néanmoins, il est décrit que cette petite GTPase est impliquée dans la polarité cellulaire via la régulation spatiale de GSK3 β et d'APC (**Etienne-Manneville and Hall, 2003**). Par ailleurs, la

phosphorylation de GSK3 β par LKB1 active la voie transcriptionnelle dépendante de la β -caténine (**Kim and Kimmel, 2006**). Il a été décrit que LKB1 favorise la polarité épithéliale en déstabilisant les MTs interphasiques (**Hernandez and Tirnauer, 2010**).

B – Trafic/transport intracellulaire

Les MTs sont indispensables au trafic intracellulaire de vésicules membranaires (endosomes, lysosomes) et au transport de protéines, d'ARNm, des chromosomes, ou des MTs eux même et d'organites (noyau, mitochondrie, golgi, réticulum endoplasmique), en servant de « rails » aux moteurs moléculaires (cf. **page 115**) de la famille des dynéines ou des kinésines (**Akhmanova and Steinmetz, 2015**). La direction, dans laquelle sont transportées ces cargaisons via les MTs, est déterminée en fonction du moteur moléculaire choisi. Ce choix est finement régulé par la cellule. Les complexes dynéine/dynactine (cf. **page 118**) assurent majoritairement le trafic rétrograde, de l'extrémité (+) vers l'extrémité (-), tandis que les kinésines (cf. **page 121**) assurent le transport antérograde, de l'extrémité (-) vers l'extrémité (+) (cf. **Figure 25-A**). Ainsi, la polarité du réseau microtubulaire (cf. **page 41**) joue aussi un rôle important dans le transport intracellulaire. Dans la cellule, le transport antérograde correspond au transport à partir du RE (*Réticulum Endoplasmique*) vers l'appareil de Golgi, alors que le trafic allant de l'appareil de Golgi vers le RE correspond au transport rétrograde (cf. **Figure 25-B**). Par exemple, la kinésine-1 est impliquée dans le trafic post-golgien en direction de la membrane plasmique. L'activité des différents moteurs est régulée par un grand nombre de protéines accessoires, qui participent au recrutement de ces derniers sur les membranes des organites (**Kini and Collins, 2001**). Parmi celles-ci, il y a les protéines Rab, ainsi que les JIPs (*JNK-Interacting Proteins*), dont la JIP-1 et JIP-3 pour la kinésine-1 (**Sun et al., 2017** ; cf. **page 131**). Ces protéines adaptatrices permettent *in fine* de faciliter le transport intracellulaire en augmentant l'interaction transitoire des moteurs avec les MTs.

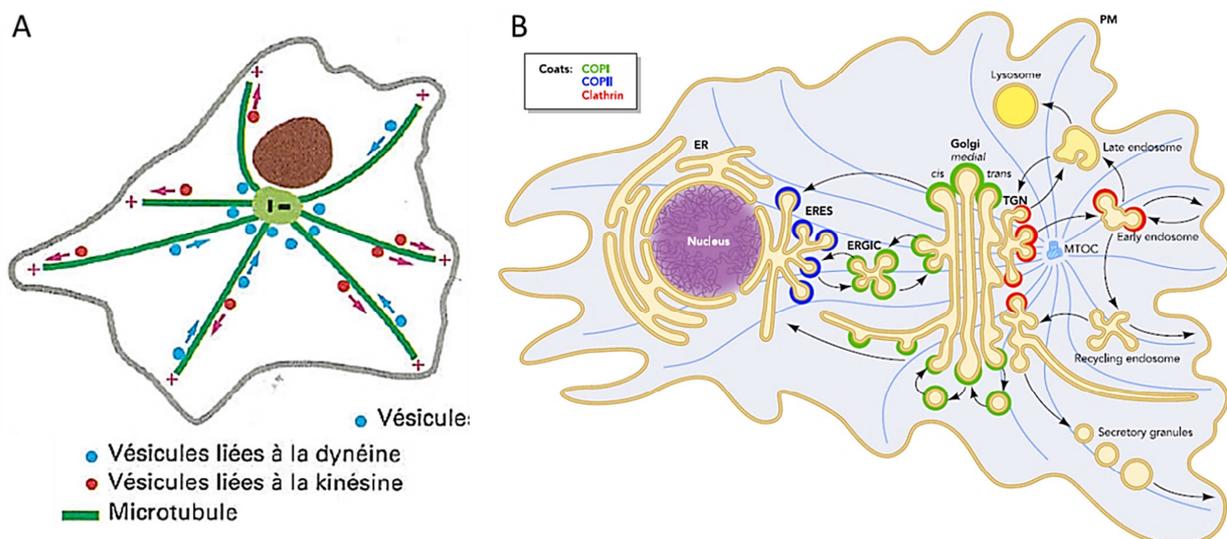


Figure 25 : Transport intracellulaire. (A) Organisation du transport vésiculaire par les protéines motrices des microtubules : la dynéine et la kinésine dans un fibroblaste (d'après **Alberts et al., 2011**). (B) Transport rétrograde et antérograde des voies d'endocytose, dans la cellule (**Szul and Sztul, 2011**).

B1 – Transport des vésicules, organites d'endocytose et d'exocytose

Différentes sortes d'endocytose sont connues : les endocytoses clathrine- et cavéole-dépendantes ou indépendantes, ainsi que la phagocytose et la macropinocytose. La phagocytose est un processus essentiel de l'immunité qui assure l'élimination de pathogènes. La macropinocytose correspond à l'invagination de la membrane cellulaire, formant une vésicule, le macropinosome qui est rempli de liquide et de molécules de l'espace extracellulaire. Le macropinosome ainsi formé est ensuite dirigé vers un endosome précoce puis un lysosome permettant la libération de son contenu.

Lors de l'endocytose, les MTs sont impliqués dans le trafic des cavéoles, et plus particulièrement dans l'adressage des vésicules à cavéoline aux endosomes. Les protéines motrices qui connectent les vésicules à cavéoline aux MTs sont inconnues (**Echarri and Del Pozo, 2015**). Une fois arrivées aux endosomes de manière dépendante des MTs, les vésicules d'endocytose s'accrochent et fusionnent avec eux, afin de libérer leur contenu internalisé depuis la surface cellulaire (cf. **Figure 26**). Les endosomes sont à leur tour transportés le long des MTs sur de grande distance vers les extrémités (+) des MTs via les kinésines. Contrairement à la majorité, le transport des endosomes vers les extrémités (-) des MTs est effectué par KIFC2 (une kinésine de la famille 14) et non par la dynéine (**Hirokawa and Noda, 2008**). Les MTs sont également impliqués dans l'initiation du recyclage de la cavéoline à partir des endosomes de recyclage, via ILK (*Integrin-Linked Kinase*), IQGAP1 (*IQ motif containing GTPase Activating Protein 1*) et mDia1/formin (**Echarri and Del Pozo, 2015** ; cf. **Figure 26**).

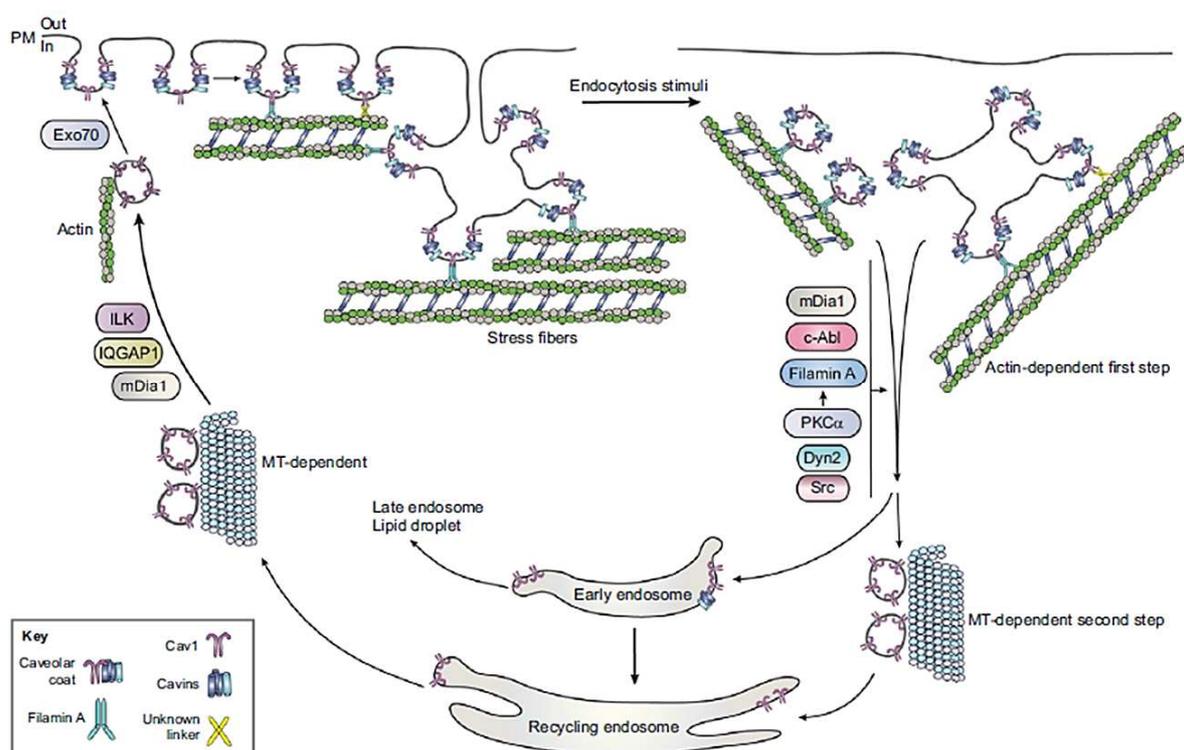


Figure 26 : Rôle du cytosquelette d'actine et des microtubules dans le trafic des vésicules à cavéoline avec les protéines associées impliquées dans l'endocytose et le recyclage des cavéoles. Les microtubules sont impliqués dans le transport des vésicules à cavéoline (Cav1) vers les endosomes ainsi que leur recyclage vers la membrane plasmique (**Echarri and Del Pozo, 2015**).

Les endosomes tardifs n'ont pas la même mobilité que les endosomes précoces et peuvent fusionner avec les lysosomes, qui ont un rôle clé dans la dégradation de molécules intracellulaires par des enzymes et grâce à leur pH acide. Lors de l'autophagie, les autophagosomes fusionnent aussi avec les lysosomes. Ces compartiments membranaires sont renouvelés par des membranes golgiennes. Tout comme la majorité des cargaisons, les lysosomes sont transportés le long des MTs en direction de leurs extrémités (-) via la dynéine cytoplasmique (cf. **page 115**) et en direction de leurs extrémités (+) grâce aux kinésines-1, -2 et -13 (cf. **page 121**) (**Hirokawa and Noda, 2008**).

L'exocytose est le processus inverse de l'endocytose, dans lequel les vésicules sont transportées vers la surface cellulaire, où elles fusionnent avec la membrane plasmique pour libérer leur contenu dans l'espace extracellulaire (**Bonifacino and Neefjes, 2017**). L'exocytose constitutive permet à la cellule de maintenir son homéostasie, notamment lors de la phagocytose, mais aussi de délivrer des composés dans l'espace extracellulaire et aux structures d'adhérences. Par ailleurs, l'exocytose régulée assure la libération de cargaisons spécifiques dans différents types cellulaires différenciés qui peuvent être finement contrôlés dans l'espace et le temps par diverses voies de signalisation (cf. **Figure 27**). Ce second type d'exocytose joue un rôle important dans de multiples processus cellulaires, dont la neurotransmission synaptique dans les neurones, le système endocrinien et paracrine, ainsi que la libération d'enzymes hydrophobiques par les cellules intestinales et les leucocytes (**Noordstra and Akhmanova, 2017**).

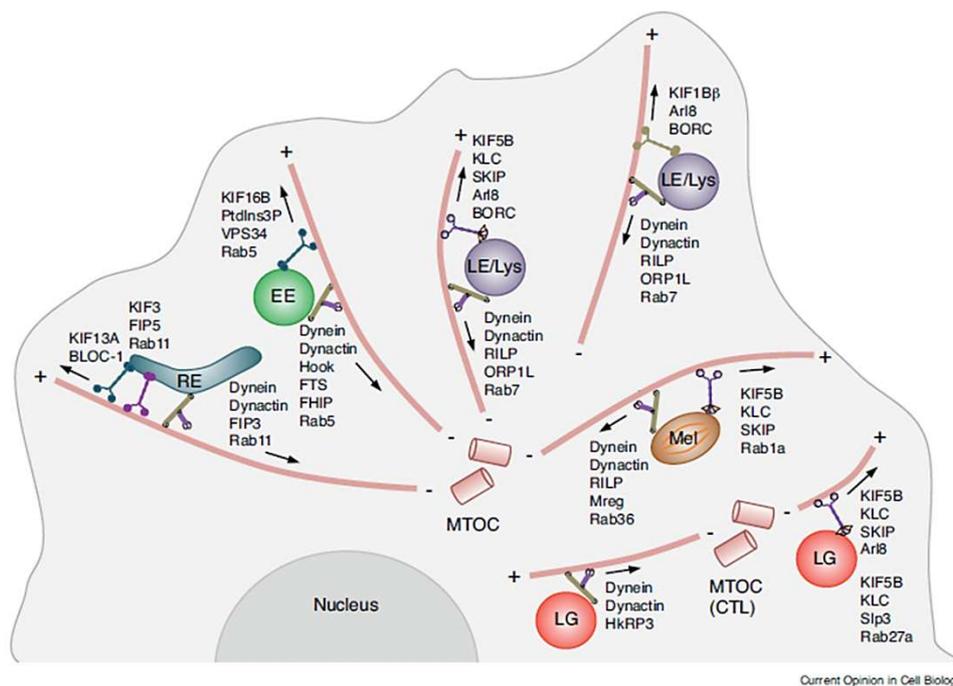


Figure 27 : Rôle des microtubules dans le transport des vésicules d'endocytose et d'exocytose. Les vésicules sont transportées par les microtubules grâce aux moteurs moléculaires et leurs protéines adaptatrices associées. (RE : *Recycling Endosome*, LE : *Late endosome*, Lys : *Lysosome*, Mel : *Melanosome*, LG : *Lytic Granule*, MTOC : *Microtubule-Organizing Center*, CTL : *activated Cytotoxic T Lymphocytes*) (**Bonifacino and Neefjes, 2017**).

L'exocytose se déroule en plusieurs étapes. Tout d'abord, les vésicules d'exocytose se forment au niveau de l'appareil de Golgi. Puis, elles sont transportées le long des MTs vers la périphérie cellulaire (cf. **Figure 27**). Enfin, les vésicules fusionnent avec la membrane plasmique avec l'aide de récepteurs solubles (SNAREs) et de facteurs qui capturent les extrémités (+) des MTs. Ces facteurs sont majoritairement des +TIPs (cf. **page 87**), telles que CLASP, CLIP-170 et APC (cf. **Figure 28**). En plus de ces effecteurs, au niveau du cortex cellulaire, il y a aussi des protéines d'échafaudage associées au cytosquelette d'actine ou directement à la membrane plasmique. Afin d'attacher les MTs au cortex cellulaire, au centre une protéine d'échafaudage corticale (IQGAP1) fait le lien entre les protéines microtubulaires et corticales (cf. **Figure 28**), cela a notamment été décrit pour CLIP-170 (**Fukata *et al.*, 2002**). Il est important de noter que l'interaction entre IQGAP1 et APC ou CLASP est négativement régulée par la kinase GSK3 β (**Noordstra and Akhmanova, 2017** ; cf. **Figure 28**), qui est absente du front de migration des cellules.

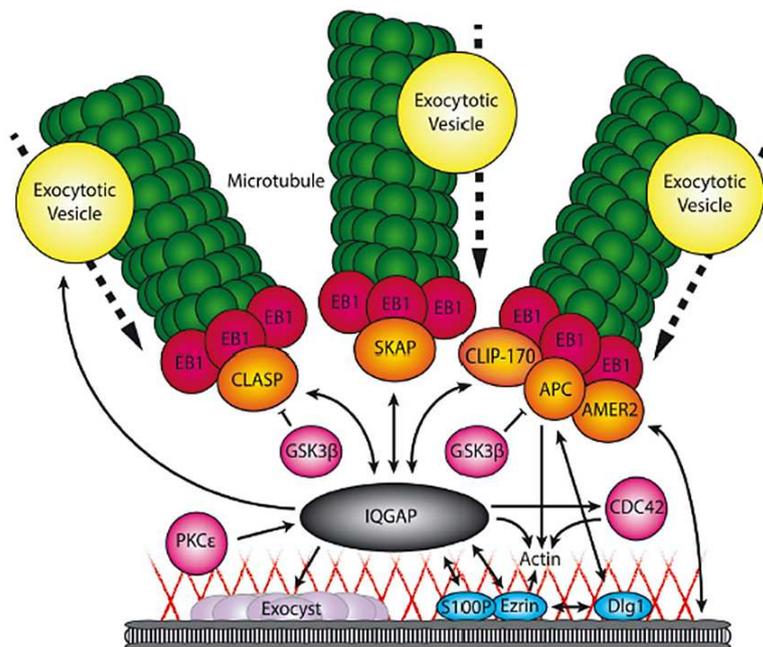


Figure 28 : Implication des microtubules dans l'exocytose. Les microtubules corticaux (en vert) sont capturés au niveau de la périphérie cellulaire via IQGAP1 (en gris) qui interagit avec des protéines associées aux extrémités (+) des microtubules (+TIPs, en orange), des protéines du cortex cortical (en bleu) qui facilitent la capture des microtubules dans des sites ayant une forte activité sécrétrice, ainsi que le complexe d'exocytose (en violet). En même temps, IQGAP1 interagit avec les vésicules d'exocytose (en jaune) et les filaments d'actine (lignes rouges) (**Noordstra and Akhmanova, 2017**).

L'endocytose et l'exocytose participent à la formation et à la modification de l'adhérence cellulaire avec la matrice extracellulaire (**Stebens and Wittmann, 2012** ; cf. **Figure 29**). La liaison des extrémités (+) des MTs aux points d'adhérence focale (FAs) peut également favoriser leur remodelage et ainsi faciliter la migration des cellules (**Noordstra and Akhmanova, 2017**).

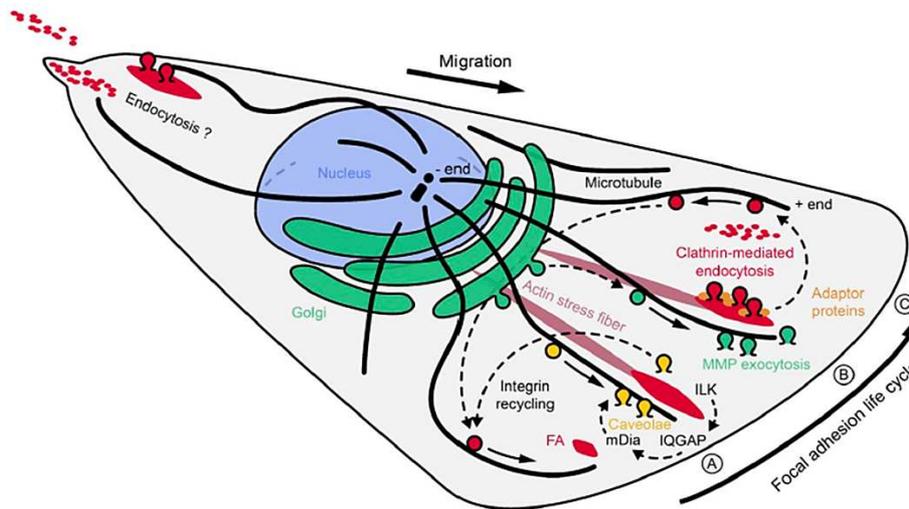


Figure 29 : Trafic intracellulaire assuré par les microtubules impliqué dans la dynamique des points d'adhésion (FAs). (A) LE complexe ILK/IQGAP1/mDia1 participe à la stabilisation des MTs (en noir) près de la périphérie cellulaire, assurant le transport des vésicules à cavéoline pour former les FAs (en rouge). (B) Au niveau du front de migration, le désassemblage des FAs est initié par la dégradation de la matrice extracellulaire via l'exocytose de métalloprotéases (MMP) dépendante des microtubules. (C) Les intégrines sont internalisées par différents mécanismes d'endocytose et partiellement recyclés (Stehbens and Wittmann, 2012).

B2 – Transport des chromosomes pendant la mitose

Lors de la division cellulaire, le réseau microtubulaire est réarrangé en un fuseau mitotique. Ce dernier sert de « rail » pour la ségrégation des chromosomes entre les deux cellules filles. L'alignement et la séparation des chromosomes durant la mitose dépendent en grande partie de l'interaction entre les kinétochores et les MTs du fuseau mitotique, ainsi que les protéines motrices (cf. **Figure 30**). Le fuseau mitotique des cellules de mammifères contient deux catégories de MTs : les MTs attachés aux kinétochores et les MTs non attachés aux kinétochores, aussi appelés MTs chevauchant (*overlap*), inter-polaires ou astraux (**Tolić, 2017** ; cf. **Figure 30**).

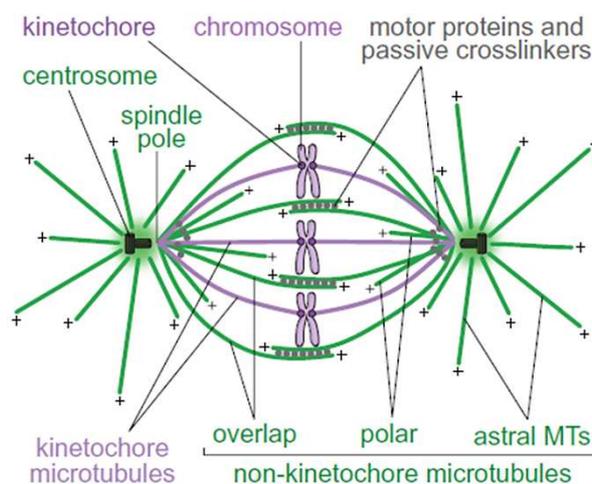


Figure 30 : Représentation du fuseau mitotique. Mise en évidence des deux populations de microtubules, ceux attachés aux kinétochores (en violet) et ceux non-attachés aux kinétochores (en vert) (**Tolić, 2017**).

Le kinétochore est un complexe protéique en forme de plaque situé à la face externe du centromère sur le chromosome mitotique (cf. **Figure 31-A**). Chez l'homme, plus de

quatre-vingt composants du kinétochore ont été identifiés par spectrométrie de masse en utilisant les données obtenues sur le kinétochore de la levure bourgeonnante, mais son architecture protéique varie en fonction des phases de polymérisation et dépolymérisation des MTs (Wan *et al.*, 2009 ; Weir *et al.*, 2016 ; cf. Figure 31-A et B).

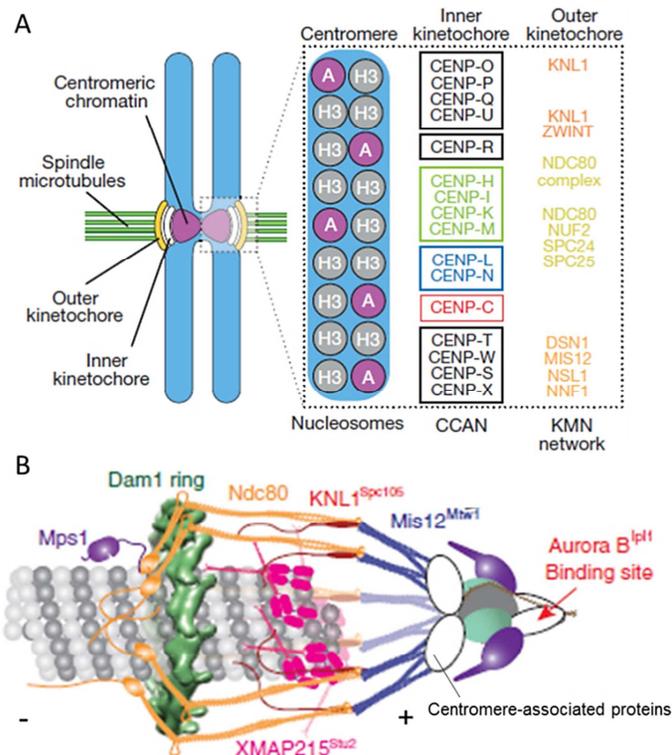


Figure 31 : Le kinétochore. (A) Complexe multi-protéique du kinétochore humain reconstitué à partir de données sur le kinétochore de la levure (d'après Weir *et al.*, 2016). (B) Reconstitution de l'architecture protéique du kinétochore de la levure bourgeonnante (d'après Joglekar and Kukreja, 2017).

Pendant la division cellulaire, le kinétochore assure le transport (congression) et l'attachement du chromosome aux microtubules dynamiques du fuseau mitotique (Auckland and McAinsh, 2015 ; cf. Figure 32), fonctionnant comme un important point de contrôle mitotique, ainsi que la génération de la force nécessaire pour le mouvement des chromosomes. En métaphase, le mouvement des chromosomes en direction des pôles du fuseau mitotique est permis par la dépolymérisation des MTs, tandis que le mouvement inverse est assuré par la polymérisation des MTs. Le kinétochore assure la connexion des chromatides filles aux pôles opposés du fuseau mitotique. Par conséquent, les kinétochores permettent de maintenir la stabilité génomique.

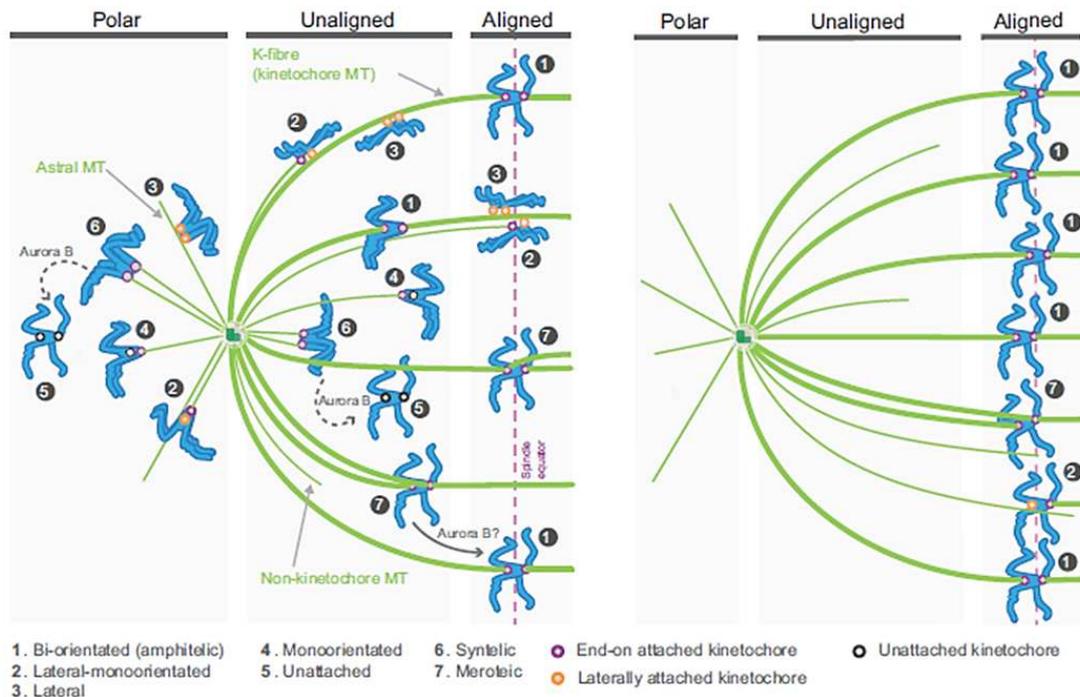


Figure 32 : Transport (congression) et alignement des chromosomes pendant la prométaphase et la métaphase (Auckland and McAinsh, 2015).

Par ailleurs, le kinétochore est ancré au niveau de l'extrémité (+) des MTs, où sont localisés des moteurs moléculaires (cf. page 115) et des protéines associées aux MTs (MAPs ; cf. page 75). Ces protéines participent à la dynamique des MTs et aident le kinétochore dans ses fonctions (Guo *et al.*, 2013 ; Joglekar and Kukreja, 2017 ; cf. Figure 33). Par exemple, pendant la prométaphase, le complexe dynéine/dynactine emmène le kinétochore vers l'extrémité (-) des MTs, alors que la CENP-E (kinésine de la famille 7 ; cf. page 121) favorise l'ancrage du kinétochore à l'extrémité (+) des MTs (cf. Figure 33). De plus, d'autres +TIPs (cf. page 87), comme CLASP, EB1, APC, CLIP-170 et XMAP215/ch-TOG favorisent l'attachement des MTs avec les kinétochores (cf. Figure 33). C'est notamment le cas de CLIP-170, qui est connue pour faciliter l'accrochage des kinétochores aux MTs (Tanenbaum *et al.*, 2006 ; cf. page 157).

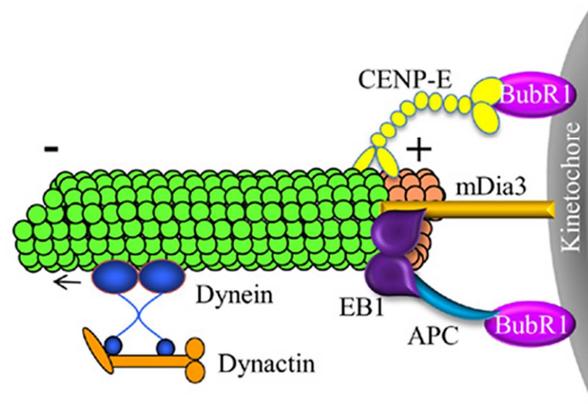


Figure 33 : Attachement des microtubules aux kinétochores. Chez la levure, la connexion des kinétochores au niveau des extrémités (+) des microtubules est facilitée par des moteurs moléculaires, tels que le complexe dynéine/dynactine (en bleu et orange) et CENP-E (en jaune), ainsi que des +TIPs, telles que EB1 (en violet) et APC (en bleu) (d'après Guo *et al.*, 2013).

B3 – Transport des organites cellulaires

Les cellules présentent une architecture bien définie dans laquelle les organites communiquent entre eux grâce au transport unidirectionnel. Cette organisation et cette communication des organites sont essentielles à la vie des cellules. Comme les autres composants du cytosquelette, le réseau microtubulaire contribue à établir et maintenir le positionnement, l'organisation spatiale de divers organites, ainsi que la structure cellulaire. Pour cela, dans les cellules non polarisées, en interphase, les MTs créés généralement un maillage partant du centrosome, près du noyau, et allant vers la périphérie cellulaire (cf. **Figure 34**). Comme nous venons de le voir, les protéines motrices associées aux MTs (cf. **page 115**) prennent en charge les cargaisons et assurent leur trafic intracellulaire à grande distance. Les MTs nucléés au niveau de l'appareil de Golgi ou les MTs déjà préformés, participent également à l'exploration du cytoplasme et au maintien des organites (**De Forges et al., 2012** ; cf. **Figure 34**). Par conséquent, si les MTs sont absents, le trafic intracellulaire, aussi bien entre les compartiments cellulaires que vers la surface cellulaire sera moins efficace, et cela engendra la perte de l'organisation spatiale et de la communication entre les organites.

Dans la plupart des cellules de mammifères, l'appareil de Golgi et les endosomes tardifs et les lysosomes sont près du noyau, ainsi que le Réticulum Endoplasmique (RE) mais il peut s'étendre jusqu'à la périphérie cellulaire, où les mitochondries y sont plutôt retrouvées (**De Forges et al., 2012** ; cf. **Figure 34**).

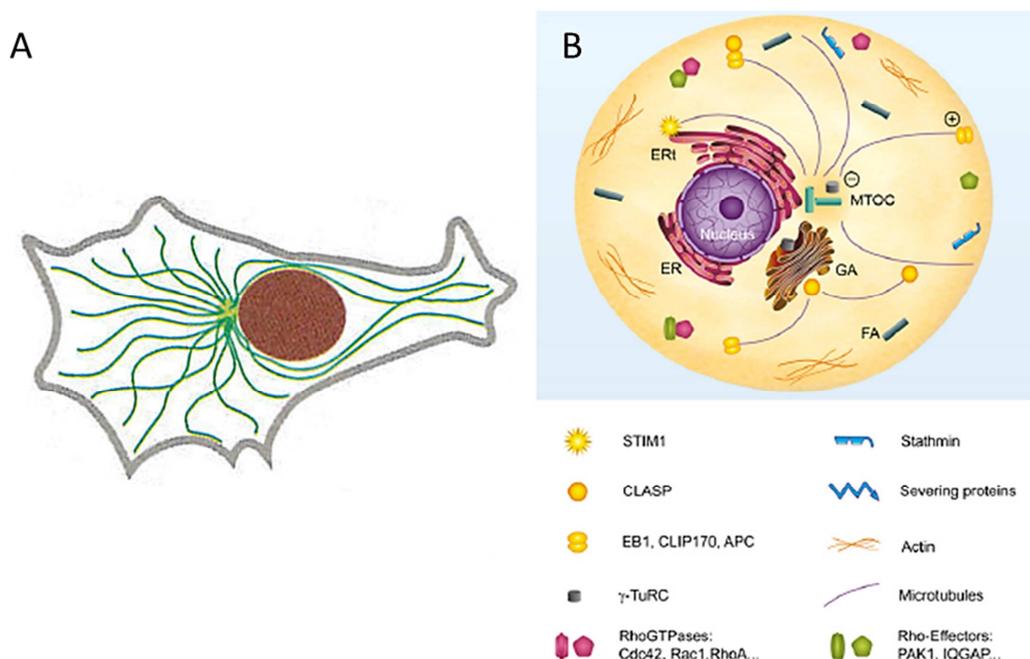


Figure 34 : Implication des microtubules et leurs protéines associées dans l'organisation intracellulaire des cellules en interphase et non polarisées. (A) Répartition des microtubules (en vert) ayant une de leurs extrémités fixée sur un centre d'organisation (centrosome) (**Alberts et al., 2011**). (B) Les extrémités (-) des microtubules sont vers le MTOC, près du noyau, tandis que les extrémités (+) explorent la périphérie cellulaire. Cette asymétrie est à l'origine d'une organisation particulière des organites, en favorisant l'extension du réticulum endoplasmique (ER, en rose) et la centralisation de l'appareil de Golgi (GA, en marron). Les microtubules golgiens formant un deuxième réseau participent également à l'organisation des organites (d'après **De Forges et al., 2012**).

L'appareil de Golgi assure un rôle majeur dans le trafic des protéines membranaires et sécrétées, de manière dépendante des MTs. Les MTs dynamiques sont nécessaires pour maintenir l'appareil de Golgi en position juxtanucléaire. Le déplacement de l'appareil de Golgi vers la périphérie cellulaire nécessite la kinésine-1 (Minin, 1997). En revanche, la protéine motrice dynéine et ses régulateurs sont importants pour la localisation du compartiment près du centrosome (Harada *et al.*, 1998). De plus, les MTs non-centrosomaux nucléés à partir de l'appareil de Golgi sont indispensables pour l'organisation de ce dernier. Ils assurent l'assemblage, le trafic, ainsi que la polarité et l'architecture cellulaire de l'appareil de Golgi (Zhu and Kaverina, 2013 ; cf. Figure 34-B).

Le RE (*Réticulum Endoplasmique*) est un organite membranaire présent dans toutes les cellules eucaryotes. L'extension des tubules du RE semble impliquer leur déplacement sur les MTs via des protéines motrices, telles que la dynéine ou la kinésine (cf. page 115). Par exemple, dans des cellules de mammifère en culture, la kinésine-1 joue un rôle primordial dans le positionnement et le mouvement du RE, en assurant le transport des membranes du RE vers la périphérie cellulaire le long des MTs. A l'inverse, la dynéine permet le transport des membranes du RE vers le centre de la cellule (Woźniak *et al.*, 2009).

Les mitochondries sont des organites cellulaires essentiels pour la production d'ATP et qui sont fortement impliquées dans les mécanismes apoptotiques. Dans les neurones, les MTs sont nécessaires pour le mouvement rapide et à grande distance des mitochondries (Larti *et al.*, 2015 ; Marchisella *et al.*, 2016). Dans les cellules animales, les MTs sont aussi essentiels à la fission/fusion des mitochondries, ainsi que leur transport (Liu *et al.*, 2015).

Concernant le maintien et le positionnement du noyau, il dépend de la dynamique des MTs chez la levure fissipare (*Schizosaccharomyces pombe*) et le champignon (*Aspergillus nidulans*) (Paluh *et al.*, 2000 ; Caron *et al.*, 2001 ; Dougherty *et al.*, 2001). Dans les neurones, la migration et donc le positionnement du noyau dépend de la dynéine (Hu *et al.*, 2013 ; cf. Figure 35). Par ailleurs, par simulation il a été montré qu'un petit changement dans l'architecture des MTs peut induire un déséquilibre entre les forces de poussée et de traction qui en émanent et déstabiliser la position du centrosome (Letort *et al.*, 2016).

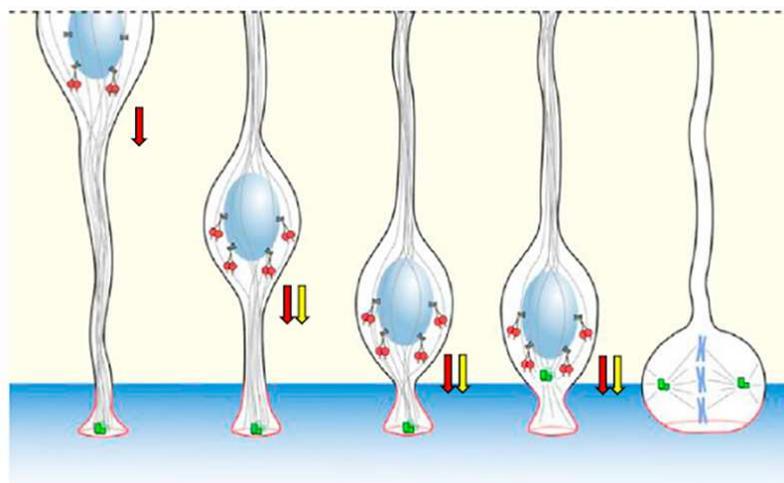


Figure 35 : Dans les neurones, le noyau est transporté le long des microtubules grâce à la dynéine (d'après Hu *et al.*, 2013).

B4 – Transport axonal

Dans les neurones, la plupart des MTs s'étendent le long des axones et des dendrites où ils sont impliqués, aussi bien dans le transport des vésicules synaptiques (ou SVP pour *Synaptic Vesicle Precursors*), du noyau (Hu *et al.*, 2013 ; cf. Figure 35) et des mitochondries (Larti *et al.*, 2015), que dans le maintien de l'architecture neuronale, participant ainsi au développement et au fonctionnement neuronal. Le transport de ces cargaisons est assuré par les moteurs moléculaires circulant sur les MTs (Franker and Hoogenraad, 2013 ; Marchisella *et al.*, 2016 ; Breuss *et al.*, 2017 ; cf. Figure 36 ; cf. page 115).

Dans les axones, ce sont les moteurs moléculaires de la famille des kinésines (principalement les kinésines-1 et -3) qui assurent le transport à longue distance des vésicules synaptiques et des mitochondries vers les extrémités (+) des MTs au niveau des synapses (Nangaku *et al.*, 1994 ; Hirokawa and Noda, 2008 ; cf. Figure 36). Par ailleurs, la forte présence de tubulines dans le cerveau et son importance dans la trafic neuronale font que les dysfonctionnements des MTs sont responsables d'anomalies cérébrales (Marchisella *et al.*, 2016).

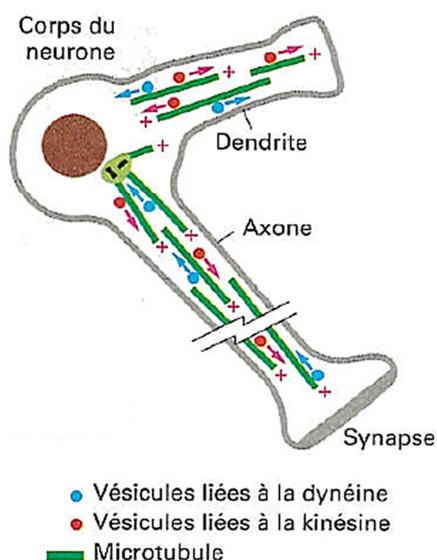


Figure 36 : Schéma d'une cellule nerveuse montrant le trafic vésiculaire le long des microtubules par les protéines motrices associées : la dynéine et la kinésine (d'après Alberts *et al.*, 2011).

B5 – Transport des virus

Les MTs assurent également un rôle dans l'immunité, notamment concernant les infections virales. En effet, les protéines motrices des MTs sont largement connues pour assurer le transport des particules virales de la membrane plasmique au noyau, mais aussi du site d'assemblage du virus vers la périphérie cellulaire (Dodding and Way, 2011 ; Liu *et al.*, 2015 ; Naghavi and Walsh, 2017 ; cf. Figure 37). L'entrée et la sortie du virus de l'herpès sont contrôlées par le transport de ses particules virales le long des MTs via le recrutement des bons moteurs moléculaires (cf. Figure 37). Lors de l'entrée du virus, les particules virales transportées vers le noyau recrutent d'abord la dynéine, pour se diriger vers le MTOC, puis la kinésine, pour aller au noyau. En revanche, lors de la sortie du virus, les particules virales qui vont vers la périphérie cellulaire recrutent dans un premier temps la dynéine, pour se diriger vers le MTOC, et dans un second temps la kinésine (Dodding and Way, 2011). Parmi les

protéines adaptatrices (cf. **Figure 37**) assurant le trafic viral, on retrouve CLIP-170, EB, et la dynactine, où CLIP-170 assure la capture et l'initiation du transport des particules du virus de l'herpès de manière dépendante de la dynéine (**Jovasevic et al., 2015** ; cf. **page 115**).

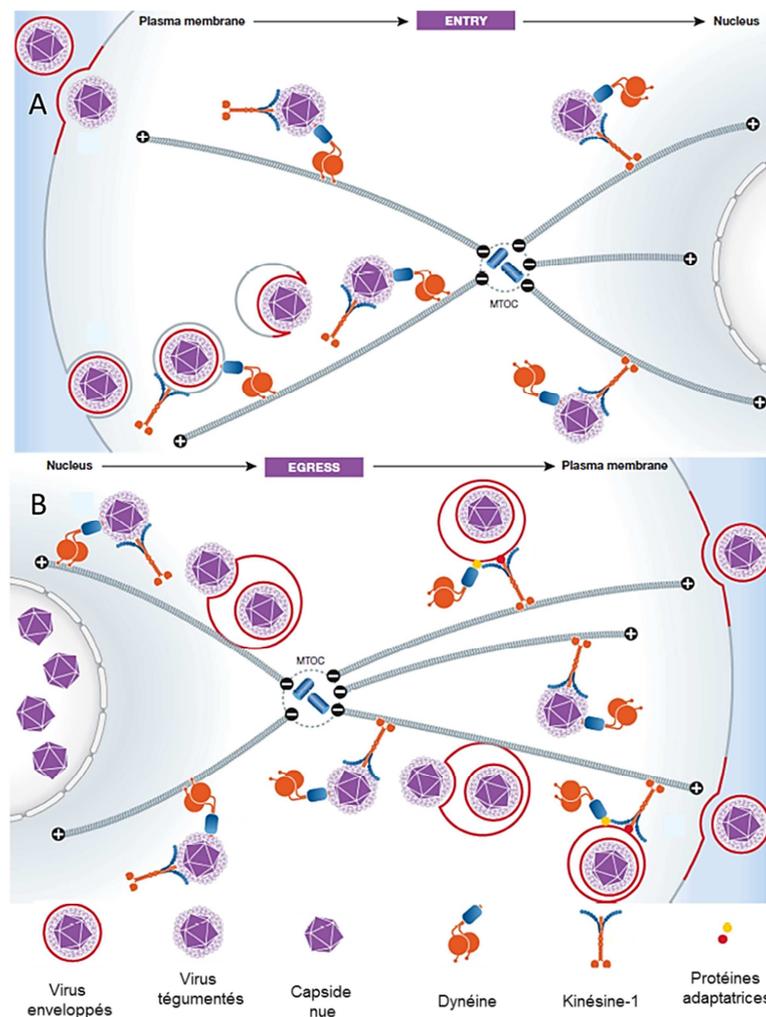


Figure 37 : Implication des microtubules et des moteurs moléculaires dans le transport des particules virales de l'herpès dans les cellules humaines. L'entrée (A) et la sortie (B) des virus sont montrées (d'après **Dodding and Way, 2011**).

B6 – Voies de signalisation

Les MTs assurent aussi un rôle clé dans la transduction du signal. Pour cela, ils régulent un grand nombre de facteurs de signalisation, en contrôlant leur localisation et leur abondance. Parmi ces facteurs, on compte de nombreuses protéines kinases, phosphatases, des molécules adaptatrices et des facteurs de transcription. Ces effecteurs sont liés aux MTs, soit en s'associant directement à la tubuline, soit en interagissant avec des protéines associées aux MTs (**Gundersen and Cook, 1999** ; **Muroyama and Lechler, 2017**). Par exemple, la protéine d'échafaudage JIP-1 permet le rapprochement spatial et le transport sur les MTs via la kinésine-1 de kinases impliquées dans la voie de signalisation de la kinase de stress JNK (**Daire and Poüs, 2011** ; **Zeke et al., 2016**).

Par ailleurs, au laboratoire, il a été montré que les sous-populations de MTs stables et dynamiques peuvent avoir un rôle fonctionnel dans la transduction du signal. Dans ce sens, il a été démontré que la signalisation de STAT5B, un facteur de transcription de la voie

JAK/STAT est fortement et spécifiquement dépendante des MTs dynamiques (**Phung-Koskas *et al.*, 2005**).

Il a été mis en évidence que le niveau d'acétylation des MTs est un facteur important permettant aux cellules de s'organiser et possiblement de coordonner plusieurs voies de signalisation le long des MTs. De plus, les facteurs de signalisation s'accrochant aux MTs peuvent être chaperonnés par Hsp90, qui est une protéine qui contrôle l'activité de nombreuses protéines (environ 650) impliquées dans la prolifération cellulaire ou l'apoptose (**Giustiniani *et al.*, 2009**). Par exemple, dans des situations de stress, le niveau d'acétylation des MTs est augmenté et cela influence le recrutement d'Hsp90 sur les MTs (**Giustiniani *et al.*, 2009**). Il a aussi été montré qu'après privation des cellules en nutriments, l'acétylation de la tubuline est augmentée, aussi bien sur les MTs dynamiques que les MTs stables et stimule l'autophagie en contribuant à la formation de l'autophagosome. Cette hyper-acétylation des MTs sur la Lys40 de l' α -tubuline augmente le recrutement des complexes de signalisation Kinésine-1/JIP-1/JNK (*c-Jun N-terminal Kinase*) sur les MTs permettant *in fine* la phosphorylation et l'activation de la kinase de stress JNK (**Geeraert *et al.*, 2010** ; cf. **Figure 38**).

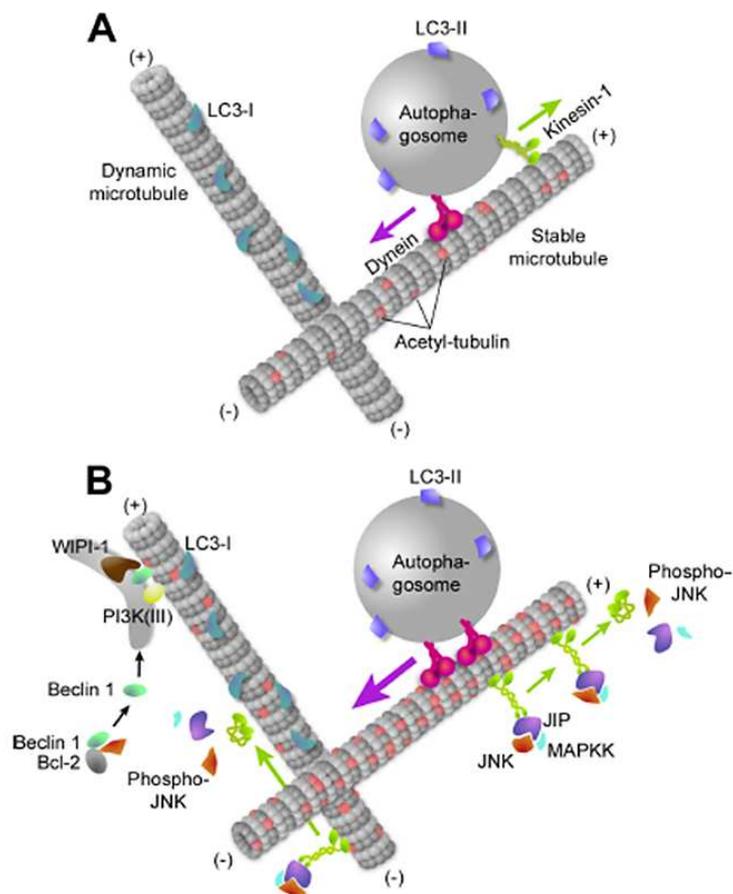


Figure 38 : Rôle des microtubules dans l'autophagie induite après privation des cellules en nutriments. (A) En condition de nutrition normale, l'autophagosome (en gris) est transporté vers les extrémités (-) et (+) par la dynéine (en rose) et la kinésine-1 (en vert) sur les microtubules stables et acétylés (en gris et rose). (B) Après privation des cellules en nutriments, la tubuline est hyperacétylée (en rose), augmentant le recrutement de la kinésine-1 (en vert), qui cette fois-ci ne transporte plus l'autophagosome mais la voie des MAP kinases (en bleu) via JIP (en violet), engendrant la phosphorylation et donc l'activation de JNK (en marron) (**Geeraert *et al.*, 2010**).

Une autre étude au sein du laboratoire a permis de mettre en évidence qu'en condition de stress, l'hyper-acétylation est un processus rapide et réversible résultant en l'induction d'une acétyltransférase-1 de tubuline (α TAT1/MEC-17 : *acétyltransférase-1*), via la libération de ROS (*Reactive Oxygen Species*) par les mitochondries, puis l'activation de l'AMPK (Mackeh *et al.*, 2014). Le laboratoire a montré qu'en condition de stress, cette hyperacétylation des MTs augmente les événements de fission des mitochondries via l'induction de la phosphorylation de Drp1 sur la Ser616, de manière dépendante de la voie Kinésine-1/JIP-1/JNK (Perdiz *et al.*, 2017).

IV - Les microtubules comme cible thérapeutique

Dans les carcinomes, les cellules épithéliales perdent leur polarité apico-basale, ont une division incontrôlée et acquièrent la capacité de migrer avec un caractère invasif (Gandalvočová *et al.*, 2016 ; cf. Figure 39). Du fait de leurs rôles primordiaux dans la formation du fuseau mitotique et la migration des cellules (cf. Figure 39), les microtubules peuvent être une cible importante lors des thérapies anticancéreuses (Risinger *et al.*, 2009 ; Kingston, 2009 ; Calligaris *et al.*, 2010). Effectivement, les agents antimitotiques qui empêchent le bon déroulement de la mitose, conduisent éventuellement à l'induction de l'apoptose des cellules cancéreuses (Prota *et al.*, 2013a). Les premiers traitements antimitotiques qui ont été décrits sont des agents bloquant la formation du fuseau. Aujourd'hui, ces agents sont couramment utilisés en thérapie anticancéreuses dans différents types de cancers (Salmela and Kallio, 2013 ; Penna *et al.*, 2017).

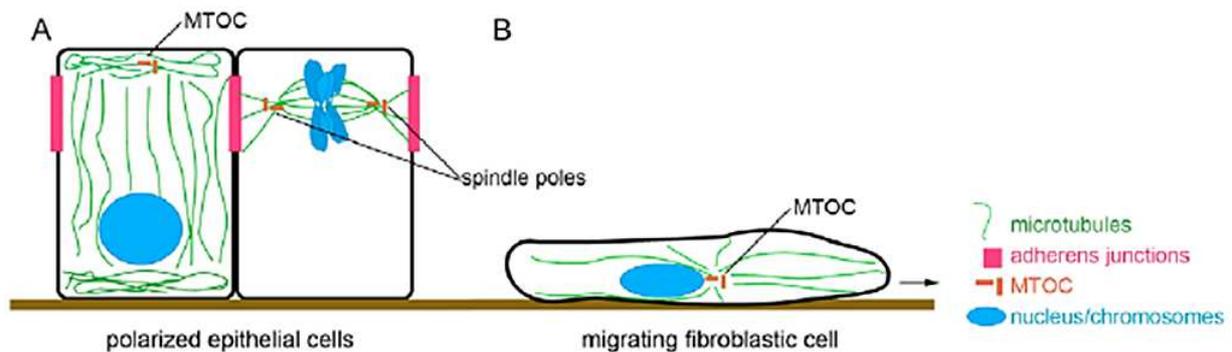


Figure 39 : Organisation des microtubules (A) dans des cellules épithéliales polarisées en interphase et en mitose, (B) ainsi que dans un fibroblaste en migration (Hernandez and Tirnauer, 2010).

La plupart des agents ciblant les MTs (MTAs : *Microtubule-Targeting Agents*) proviennent des plantes (Xie and Zhou, 2017). Les MTAs se lient sur des sites spécifiques, soit à la tubuline libre, soit à la tubuline polymérisée dans les MTs (Jordan and Wilson, 2004 ; Calligaris *et al.*, 2010 ; Dumontet and Jordan, 2010 ; Amos, 2011 ; Penna *et al.*, 2017 ; cf. Figure 40).

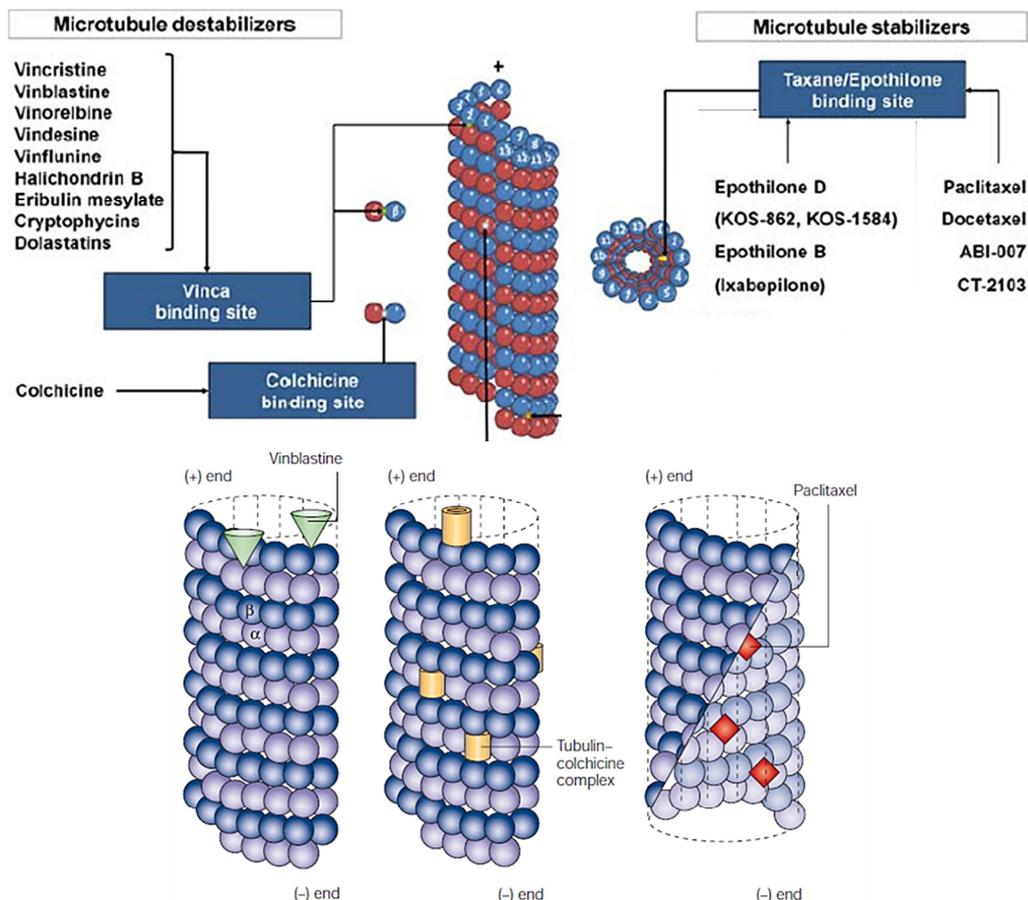


Figure 40 : Sites de fixation des agents antimitotiques sur les microtubules (d'après **Calligaris et al., 2010**; **Jordan and Wilson, 2004**). La vinblastine se lie avec une grande affinité à la sous-unité β de la tubuline située à l'extrémité (+) des MTs, où elle supprime la dynamique des MTs. La colchicine forme des complexes avec les dimères de tubuline. La tubuline liant la colchicine peut co-polymériser dans les MTs. Le paclitaxel se lie à l'intérieur du MT, empêchant sa dépolymérisation (**Jordan and Wilson, 2004**).

A - Les taxanes et vinca-alcaloïdes

Les classes de MTAs les plus répandues et ayant le plus de succès thérapeutiques dans les cancers sont les taxanes et les vinca-alcaloïdes (**Penna et al., 2017**). Les taxanes (principalement paclitaxel et docetaxel) et les épothilones (patupilone, ixabepilone) sont des agents stabilisateurs des MTs (**Penna et al., 2017**), facilitant l'assemblage et la stabilisation des MTs. Tandis que, les vinca-alcaloïdes (vinblastine, vincristine), l'éribuline et la colchicine sont des agents déstabilisateurs des MTs (**Penna et al., 2017**), qui dépolymérisent les MTs.

Lors d'une campagne de recherche de composés actifs anticancéreux présents chez les plantes dans les années 1960, le paclitaxel (Taxol®) a été découvert. Il est devenu le membre fondateur de la classe des taxanes (**Cragg, 1998**). Ce composé a été isolé originellement dans des extraits bruts venant de l'écorce de l'if du Pacifique (*Taxus brevifolia* Nutt) (**Xie and Zhou, 2017**). Le paclitaxel se lie dans le domaine intermédiaire de la β -tubuline à l'intérieur de la lumière des MTs (**Wani et al., 1971** ; cf. **Figure 40**). La liaison du paclitaxel aux microtubules résulte en une diminution de la dynamique des MTs (cf. **Figure 41**) et l'arrêt des cellules en mitose (**Xie and Zhou, 2017**). Cette diminution de l'instabilité dynamique des MTs par le paclitaxel est montrée par une altération de l'évolution de leur longueur en

fonction du temps (cf., **Figure 41**). Le paclitaxel stabilise les MTs en empêchant leur dépolymérisation et en stimulant l'assemblage des dimères, ainsi qu'en stabilisant les liens latéraux entre MT voisins (**Prota et al., 2013a**). De plus, de façon surprenante il ralentit la croissance des MTs (**Zanic et al., 2013**). Ce ralentissement viendrait du fait que le paclitaxel redresse les protofilaments des extrémités des MTs (**Elie-Caille et al., 2007**). Le Taxol® peut se lier à de la tubuline-GTP (**Arnal and Wade, 1995**), mais, en présence de Taxol®, le GTP est hydrolysé normalement par la β -tubuline (**Amos, 2011**). Seul ou en combinaison avec d'autres molécules anticancéreuses, le paclitaxel est devenu l'un des agents de chimiothérapie les plus communément utilisés pour la prise en charge de nombreux cancers, comme les cancers broncho-pulmonaires, les cancers du sein et de l'ovaire, ainsi que le mélanome et le sarcome de Kaposi associé au sida (**Xie and Zhou, 2017**).

Le docetaxel est un analogue plus efficace du paclitaxel. Il a été approuvé pour être utilisé seul ou avec d'autres molécules pour le traitement des cancers, tels que les cancers du sein, des poumons et de la prostate (**Xie and Zhou, 2017**).

Les épothilones ont été isolées originellement à partir de la mycobactérie *Sorangium cellulosum* (**Dumontet and Jorgan, 2010**). Elles sont plus efficaces que le docetaxel et le paclitaxel (**Xie and Zhou, 2017**).

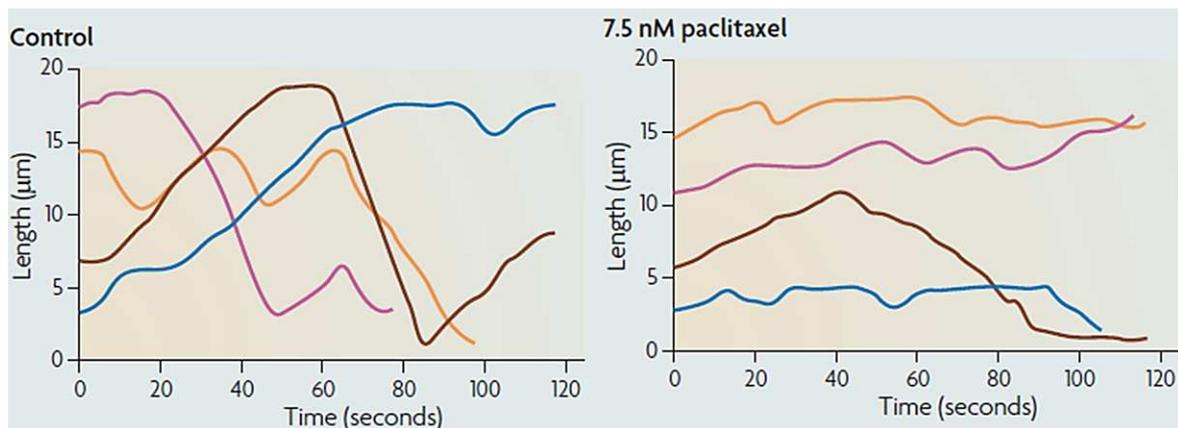


Figure 41 : Dynamique des MTs diminuée en présence de paclitaxel (**Dumontet and Jordan, 2010**).

Les vinca-alcaloïdes (vinblastine et vincristine) correspondent à la seconde famille de MTAs classiques. Ces agents ont été extraits des feuilles de la pervenche de Madagascar (*Catharanthus roseus*) et caractérisés structurellement dans les années 1950-1960 (**Noble et al., 1958**). Ils se lient à un site localisé à la surface entre les hétérodimères de tubuline, nommé le domaine vinca-alcaloïde (**Moudi et al., 2013** ; cf. **Figure 40**). En présence de vinblastine, l'hydrolyse du GTP est inhibée (**Amos, 2011**).

À des concentrations sub-stoichiométriques, les vinca-alcaloïdes s'associent avec une grande affinité aux tubulines situées aux extrémités (+) des microtubules (cf. **Figure 40**). Cela provoque la suppression de l'assemblage des MTs (**Xie and Zhou, 2017**). Par ailleurs, à des concentrations plus élevées, les vinca-alcaloïdes se lient aussi au niveau de sites dans la β -tubuline non polymérisée (cf. **Figure 40**), empêchant l'intégration de la tubuline dans les microtubules polymérisés (**Xie and Zhou, 2017**). Les vinca-alcaloïdes représentent l'un des traitements les plus couramment utilisés en chimiothérapie pour différents cancers, en particulier pour le traitement des cancers hématologiques (**Xie and Zhou, 2017**).

Plus récemment, d'autres composés apparentés à la famille des vinca-alcaloïdes ont été utilisés, telles que les MMAE/F (*MonoMethyl Auristatin E/F*) (Waight *et al.*, 2016). Ces agents déstabilisateurs des MTs (Waight *et al.*, 2016) sont de potentiels agents cytotoxiques contre différents types de cellules cancéreuses lorsqu'ils sont conjugués à des anticorps. Notamment, ils ciblent les cellules de Reed-Sternberg, dans le lymphome de Hodgkin (Currin and Gopal, 2012 ; Sureda *et al.*, 2014), dans lesquelles le facteur de sauvetage CLIP-170/restine est surexprimée (Delabie *et al.*, 1992 ; Bilbe *et al.*, 1992). Ces molécules lient les dimères de tubuline induisant des agrégats courbés et inhibent l'échange nucléotidique. Le MMAE est un analogue synthétique du peptide naturel dolastatin 10, composé de trois acides aminés conservés dans le MMAF, suivi d'une norephedrine (cf. Figure 42-A), qui est remplacée par une phénylalanine dans le MMAF (cf. Figure 42-B). Ces agents sont à l'origine de l'activité cytotoxique du Brentuximab vedotin (Waight *et al.*, 2016).

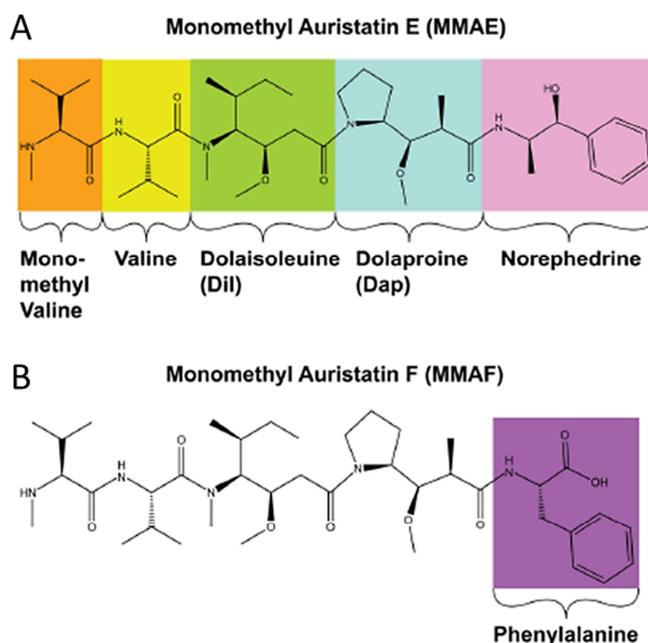


Figure 42 : Structures primaires des agents anti-microtubulaires, (A) le monomethyl auristatin E, MMAE et (B) le monomethyl auristatin F, MMAF. Leurs structures peptidiques diffèrent au niveau du dernier acide aminé (Waight *et al.*, 2016).

En plus des taxanes et des vinca-alcaloïdes, utilisés pour la lutte contre le cancer, d'autres MTAs dérivés de plantes ont été découverts. Parmi ceux-ci, la colchicine a été isolée pour la première fois à partir des bulbes et des graines du crocus d'automne (*Cochicum autumnale*). Cet agent lie l'interface entre l' α - et la β -tubuline, près de la poche à GTP de la β -tubuline (Dorleans, *et al.*, 2009 ; cf. Figure 40). La colchicine déstabilise les microtubules en supprimant la formation des connections latérales entre les protofilaments d'un MT (Xie and Zhou, 2017). En présence de colchicine, l'hydrolyse du GTP est augmentée (Amos, 2011). En clinique, ce composé a été utilisé comme un immunosuppresseur dans le traitement de plusieurs maladies immunitaires, comme la goutte, le rhumatisme, l'athérosclérose, l'inflammation et la fièvre méditerranéenne familiale (Slobodnick *et al.*, 2015).

B – Effets secondaires et résistance aux agents antimitotiques ciblant les microtubules

Malgré leur efficacité, les composés anti-microtubulaires présentent d'importants effets secondaires, tels que l'arrêt des mitoses, empêchant la prolifération des cellules de la moelle osseuse, ou les neuropathies (car les microtubules sont impliqués dans les processus de transport dans les neurones) (**Penna *et al.*, 2017 ; Jordan and Wilson, 2004**).

En plus de ces effets toxiques, l'une des limites à l'utilisation de ces MTAs est que les cellules présentent des résistances innées ou acquises aux traitements. Ces résistances acquises sont due à l'exclusion cellulaire des agents, l'expression de différentes isoformes de tubuline, la liaison de protéines régulatrices des MTs et/ou des différences dans les événements de signalisation en aval (**Bates and Eastman, 2017**). Ainsi, la surexpression du transporteur-ABC (*ATP-Binding Cassettes ou Dependent Drug Efflux Pumps*) est à l'origine de l'exclusion cellulaire des composés thérapeutiques (**Jordan and Wilson, 2004**). La composition en isotopes de la tubuline est souvent perturbée dans les cellules cancéreuses par rapport au tissu sain voisin (**Parker *et al.*, 2017**). En effet, plusieurs isotopes de la tubuline (β I-, β II-, β III-, β IVa- et β V-) sont fortement exprimées dans des cas cliniques agressifs, de résistance aux chimiothérapies (cf. **page 33**). Par exemple, la surexpression de la β -tubulineIII est un indicateur de la résistance aux taxanes et aux vinca-alcaloïdes, mais pas à la colchicine (**Bates and Eastman, 2017**). De plus, les autres isoformes (γ -, δ - et ϵ -) de tubulines, qui s'associent au centrosome peuvent, aussi être impliquées dans les mécanismes de résistance (**Parker *et al.*, 2017**). Par ailleurs, la résistance aux MTAs peut être causée par la surexpression de Bcl2 (un facteur anti-apoptotique) ou l'inhibition de la survivine (une protéine apoptotique), ainsi que la perte de la fonction du gardien du génome p53 due à l'augmentation de l'expression de MAP4, réduisant le potentiel apoptotique des cellules (**Bates and Eastman, 2017**).

Dans cette partie nous venons de voir que les MTs assurent diverses fonctions cellulaires et que leurs activités doivent être finement régulées. Dans la deuxième partie, nous allons détailler les protéines régulatrices des MTs, appelées MAPs (*Microtubule-Associated Proteins*).

Deuxième partie : les protéines associées aux microtubules et leurs fonctions

Afin de mener à bien leurs différentes fonctions, les MTs interagissent avec une multitude de protéines appelées protéines associées aux MTs, ou « *Microtubule Associated Proteins* » (MAPs) (Nogales and Zhang, 2016 ; cf. Figure 43-A). Les MAPs peuvent se lier avec les sous-unités de tubuline solubles, la *lattice* du MT et/ou les extrémités du MT selon leur action (Akhmanova and Steinmetz, 2008).

Les MAPs peuvent être séparées en deux classes, les MAPs structurales, incluant les +TIPs, les -TIPs et les MAPs motrices. Les MAPs structurales sont considérées comme des protéines liant et stabilisant les MTs (Borisy *et al.*, 1975). Au sein de cette classe, les +TIPs régulent la dynamique des MTs et l'interaction des polymères avec différents constituants cellulaires. Les MAPs motrices, quant à elles participent au transport de divers constituants cellulaires/molécules de manière directionnelle en utilisant la polarité des MTs.

I – Régulation de la dynamique des microtubules par les protéines associées aux microtubules (MAPs)

Dans les cellules vivantes, la régulation de l'instabilité dynamique des MTs par des protéines associées (MAPs) permet un remodelage rapide et drastique du cytosquelette microtubulaire durant des processus cellulaires, tels que l'assemblage du fuseau mitotique ou la migration cellulaire (van der Vaart *et al.*, 2009 ; Akhmanova and Steinmetz, 2015).

Les MAPs stabilisatrices vont stabiliser les MTs en empêchant les catastrophes, favorisant les sauvetages, ou en diminuant la vitesse de dépolymérisation. En revanche, les MAPs déstabilisatrices vont déstabiliser les MTs en induisant des catastrophes, en empêchant les sauvetages, ou en augmentant la vitesse de dépolymérisation (Howard and Hyman, 2007 ; van der Vaart *et al.*, 2009 ; Akhmanova and Steinmetz, 2010 ; Bowne-Anderson *et al.*, 2015 ; cf. Figure 43-B).

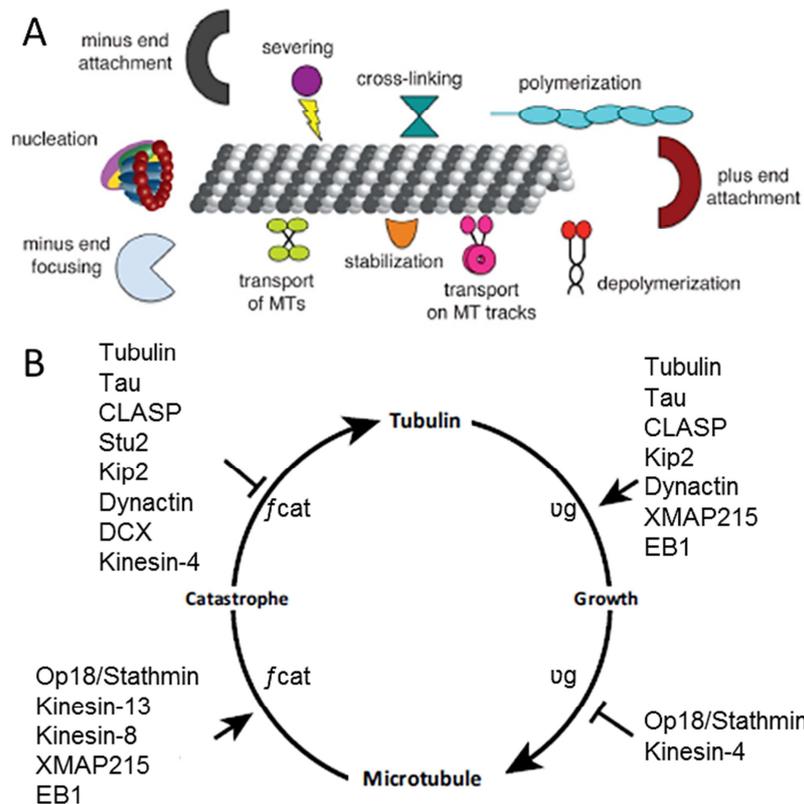


Figure 43 : Organisation des protéines associées aux microtubules (MAPs). (A) Activités des différentes classes de MAPs (Alfaro-Aco and Petry, 2015). (B) Modulation des paramètres (f_{cat} : fréquence de catastrophe et u_g : vitesse de polymérisation) de la dynamique des microtubules par les MAPs. À gauche, ce sont les MAPs qui régulent f_{cat} , tandis qu'à droite, ce sont les MAPs qui contrôlent u_g , respectivement. Les effets activateurs et inhibiteurs sont indiqués (d'après Bowne-Anderson *et al.*, 2015).

A – Les MAPs structurales stabilisatrices

Ce sous-groupe de MAPs contient des protéines impliquées dans la promotion de la croissance ou la stabilisation des MTs. Ces facteurs se lient généralement aux MTs, mais aussi à la tubuline libre (Mimori-Kiyosue *et al.*, 2005 ; Brouhard *et al.*, 2008). Dans les cellules, l'activité de ces protéines est responsable de la croissance des MTs plus rapide qu'*in vitro* à partir de tubuline pure, promouvant une processivité et une rapidité de la croissance des MTs (van der Vaart *et al.*, 2011). Dans ce sous-groupe, sont indiqués les protéines de la *lattice*, telles que, Tau, MAP2, MAP4, MAP1, DCX (*Doublecortin*), mais aussi des protéines stabilisatrices des extrémités (-) des MTs (CAMSAP).

A1 – La protéine Tau

La protéine Tau est une MAP neuronale, conservée, qui possède une homologie avec MAP2 (cf. Figures 44-A et 45) et MAP4 (cf. Figure 44). C'est un marqueur protéique des axones, aussi bien impliqué dans la génération et le maintien des neurites, que dans l'établissement de la polarité neuronale et l'élongation des axones (Cleveland *et al.*, 1977 ; Binder *et al.*, 1985 ; Drubin and Kirschner, 1986 ; Caceres and Kosik, 1990 ; Mohan and John, 2015). Tau est aussi retrouvée en quantité plus faible dans les fibroblastes où elle inhibe le transport de composants cellulaires, en interférant avec le trafic des protéines motrices (Stamer *et al.*, 2002).

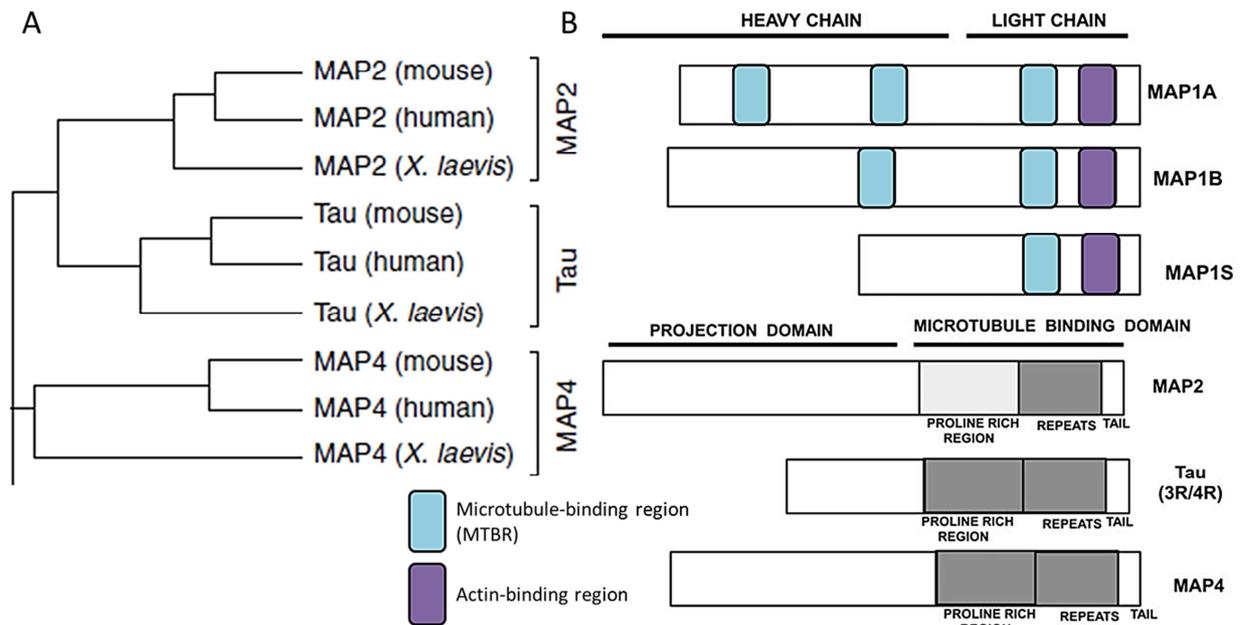


Figure 44 : Analyse phylogénétique et structure de MAPs structurales, stabilisatrices. **(A)** Evolution des MAPs neuronales (MAP2, MAP4 et Tau) entre diverses espèces (Dehmelt and Halpain, 2005). **(B)** Organisation des domaines structuraux avec les domaines de liaison aux microtubules (en bleu ou en gris), et de liaison à l'actine (en violet) de MAP1, MAP2, MAP4 et Tau (d'après Mohan and John, 2015).

La protéine Tau est constituée d'un domaine N-terminal hautement désordonné, qui est exposé à la surface des MTs et qui joue probablement un rôle dans la régulation de l'espace entre des MTs adjacents dans les axones, ainsi que la liaison à d'autres structures, comme les membranes (Chen *et al.*, 1992 ; cf. Figure 44-B). Tau contient également une région de liaison aux MTs avec d'une part, un domaine riche en proline qui est important pour la liaison et la stabilisation aux MTs, et permet aussi la dimérisation de Tau. D'autre part, un domaine MTBR (*Microtubule Binding Region*) qui assure directement la liaison de Tau à la surface des MTs (Butner and Kirschner, 1991 ; Gustke *et al.*, 1994 ; Trinczek *et al.*, 1995 ; Goode *et al.*, 1997 ; Baas and Buster, 2004 ; Mohan and John, 2015 ; cf. Figures 44-B et 45). La région MTBR consiste en trois ou quatre domaines répétés (R1, R2, R3 et R4) reliés par trois séquences inter-répétées (IR) (Baas and Buster, 2004 ; Li and Rhoades, 2017). Chaque domaine répété de la région MTBR de Tau a un motif KXGS pouvant être phosphorylé (cf. page 134). De par sa structure Tau peut faire des faisceaux de MTs sérés (cf. Figure 45).

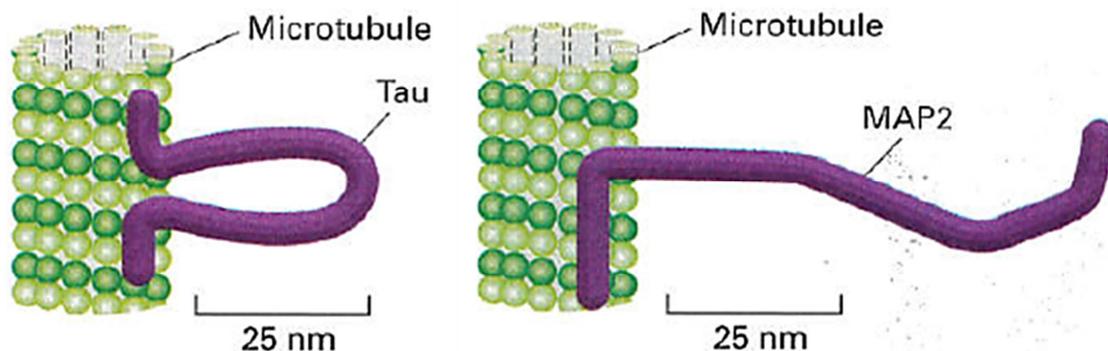


Figure 45 : Structure de Tau et MAP2, lorsqu'elles lient et stabilisent les microtubules, qui permettent de faire des faisceaux de microtubules plus ou moins sérés (d'après Alberts *et al.*, 2011).

Dans le cerveau de mammifères, Tau présente six isoformes majeures, qui sont toutes formées par épissage alternatif ou via des modifications post-traductionnelles. Ces isoformes diffèrent les unes des autres en fonction du nombre de domaines répétés, trois (3R) ou quatre (4R). Le cerveau adulte possède un nombre équivalent des isoformes de Tau, 3R et 4R. (Mohan and John, 2015). Récemment, une forte corrélation a été montrée entre la stoechiométrie du complexe Tau-tubuline et la fonction promotrice de l'assemblage des MTs de Tau, indiquant que son hétérogénéité de liaison à la tubuline (correspondante au nombre de domaines répétés liés) est importante pour sa fonction (Li and Rhoades, 2017).

Des anomalies dans la protéine Tau sont impliquées dans diverses pathologies neurodégénératives, telles que la maladie d'Alzheimer et des taupathies (Dehmelt and Halpain, 2005 ; Mohan and John, 2015). Dans la maladie d'Alzheimer, la phosphorylation de la protéine Tau (cf. pages 134 et 199) est augmentée, résultant en l'accumulation d'agrégats dans les neurones, empêchant sa liaison à la tubuline et sa fonction stabilisatrice, conduisant à la dégénération neuronale (Trinczek et al., 1995 ; Buée et al., 2000 ; Garcia and Cleveland, 2001).

A2 – Les protéines MAP2 et MAP4

Les protéines MAP2 et MAP4 montrent une forte homologie de séquence et de structure avec la protéine Tau. En effet, comme Tau elles sont constituées d'une région N-terminale exposée et d'un domaine liant les microtubules composés d'une région riche en proline et de domaines répétés (Dehmelt and Halpain, 2005 ; Mohan and John, 2015 ; cf. Figure 44).

La famille de MAP2 (*Microtubule-Associated Protein 2*) est l'une des familles de MAPs neuronales les plus abondantes. Elle est conservée (cf. Figure 44-A) et fortement exprimée dans les dendrites et dans le corps neuronal des neurones matures. De ce fait, l'expression de cette MAP neuronale est estimée comme un marqueur de la différenciation neuronale (Megjorni et al., 2005). Néanmoins, la localisation de MAP2 varie pendant le développement. En effet, au début du développement MAP2 est présente dans les neurites, puis MAP2 disparaît des axones et se concentre dans les dendrites (Mohan and John, 2015). De plus, il a été montré que pendant les premières phases du développement axonal, MAP2 s'associe avec l'actine, tandis que dans les neurones matures, MAP2 s'associe aux microtubules pour les rendre plus stables (Kwei et al., 1998).

Différentes isoformes de MAP2 sont formées par épissage alternatif et via des modifications post-traductionnelles. Deux isoformes ont une masse moléculaire élevée, MAP2a et MAP2b, tandis que les deux autres isoformes ont une masse moléculaire faible, MAP2c et MAP2d. Ces différentes isoformes ne s'expriment pas de la même façon. En effet, MAP2a, MAP2b et MAP2d sont exprimées dans le cerveau adulte, où MAP2a et MAP2b se localisent exclusivement dans les dendrites, tandis que MAP2d se localise dans les neurones et les cellules gliales. En revanche, MAP2c s'exprime dans le cerveau néonatal et lors de l'embryogénèse, où il s'associe à la formation des neurites, mais aussi dans les axones (Mohan and John, 2015). Ainsi, grâce à leurs localisations les protéines MAP2 participent au développement et à la croissance des neurites (Sánchez et al., 2000), ainsi qu'à la stabilisation des MTs.

Pendant longtemps MAP4 (*Microtubule-Associated Protein 4*) a été considérée comme une MAP non neuronale, car elle s'exprime dans différents organes. Récemment, l'expression de MAP4 a été détectée dans les cellules neuronales de cerveau des mammifères (**Tokuraku et al., 2010**). Comme Tau et MAP2, MAP4 facilite l'assemblage et permet la stabilisation des MTs (**Mohan and John, 2015**). De plus, MAP4 est capable de s'associer directement aux filaments d'actine (**Ebneth et al., 1999**).

A3 – Les protéines MAP1

Parmi les MAPs stabilisatrices il y a également les membres de la famille de MAP1 (*Microtubule-Associated Protein 1*), telles que les grosses protéines MAP1A et MAP1B, et la plus petite protéine MAP1S (cf. **Figure 44-B**). Ces protéines stabilisent les MTs, en se liant le long de la *lattice* des MTs (**Mohan and John, 2015**). Les protéines MAP1A et MAP1B sont des MAPs neuronales. Plus spécifiquement, MAP1A s'exprime majoritairement dans les neurones adultes et se localise dans les dendrites, tandis que MAP1B s'exprime principalement dans les axones des neurones en développement lors de l'embryogénèse, mais MAP1B est aussi retrouvée dans les dendrites des neurones adultes (**Halpain and Dehmelt, 2006**). En revanche, MAP1S est ubiquitaire et régule la division cellulaire et l'autophagie. Néanmoins, MAP1S est aussi retrouvée associé faiblement à la tubuline cérébrale (**Liu et al., 2012 ; Tegha-Dunghu et al., 2014**).

Les protéines de la famille de MAP1 sont constituées de chaînes lourdes et légères qui peuvent interagir ensemble, et de une à trois régions liant les microtubules, qui sont localisées dans les chaînes lourdes et/ou légères (**Halpain and Dehmelt, 2006 ; Mohan and John, 2015 ; cf. Figure 44-B**). En plus de pouvoir interagir avec les MTs, les protéines MAP1 peuvent se lier à l'actine.

De manière générale, les protéines de la famille de MAP1 assurent la coordination de la dynamique des microtubules et de l'actine pour contrôler l'extension des dendrites. De plus, MAP1B a été décrite pour jouer un rôle important dans la formation et la maturation des prolongements dendritiques, en régulant le cytosquelette d'actine (**Tortosa et al., 2011 ; Mohan and John, 2015**).

A4 – La Doublecortine (DCX)

La DCX (*Doublecortin*) est une MAP neuronale conservée dans l'évolution, mais ne montrant pas d'homologie avec les autres MAPs neuronales. Elle a été caractérisée pour la première fois en 1998, dans des patients portant des mutations dans le chromosome X et souffrant de SBH (*Subcortical Band Heterotopia*) pour les femmes et de Lissencephalie pour les hommes (**des Portes et al., 1998 ; Gleeson et al., 1998**). Ces patients, présentent un développement anormal du cortex cérébral, qui est à l'origine de plusieurs symptômes, comme l'épilepsie, la déficience intellectuelle ou la mortalité infantile. Maintenant, la DCX est connue comme étant une protéine stabilisatrice des MTs, essentielle pour la division cellulaire et la migration et la différenciation neuronale (**Fourniol et al., 2013**). Dans les embryons du vers *C. elegans*, *zyg-8* (homologue de la DCX) est importante pour la stabilisation des MTs pendant la division cellulaire (**Gönczy et al., 2001**). Néanmoins, les mutations du gène *DCX* sont à l'origine de défauts neuronaux sévères, qui ne sont pas

compensables par les autres MAPs stabilisatrices dans les neurones, mettant en évidence les fonctions essentielles de la DCX dans le développement neuronal (**Fourniol et al., 2013**).

Chez l'homme, la DCX possède quatre protéines paralogues (cf. **Figure 46**). La DCLK (*Doublecortin-Like-Kinase*) initialement connue sous le nom DCAMKL1 (*Doublecortin and CaM Kinase-Like 1*) est le paralogue le plus proche de la DCX, avec environ 72% d'identité et présente quatre isoformes provenant d'épissage alternatif, telles que DCX-like. La similarité entre DCX et DCLK a été montrée par sa compensation fonctionnelle chez la souris. Parmi les paralogues humains, il y a aussi DCK2, DCDC2 et RP1 (*Retinitis Pigmentosa 1*), une protéine qui est mutée dans la rétinite pigmentaire (une forme commune de cécité héréditaire) et son activité stabilisatrice des MTs est essentielle pour le développement des cellules photo-réceptrices (**Liu et al., 2004 ; Fourniol et al., 2013**).

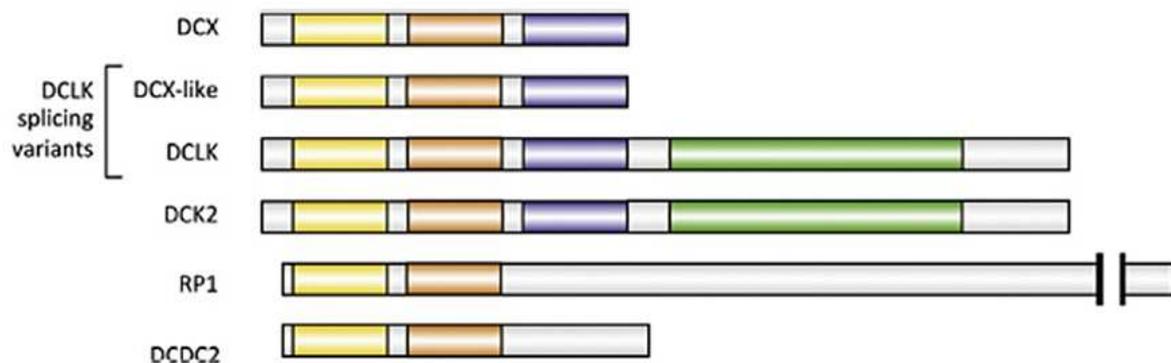


Figure 46 : Protéines paralogues humaines de la DCX, contenant tous deux domaines DC (N-DC en jaune et C-DC en orange). En plus, certains paralogues possèdent un domaine kinase (en vert) et/ou un domaine riche en Ser/Pro (en bleu) (**Fourniol et al., 2013**).

La DCX est une protéine de 40 kDa (~ 366 acides aminés), qui est constituée d'un tandem de deux domaines homologues, appelés DC, permettant la liaison aux MTs. Ces domaines sont séparés par une séquence non-structurée, mais bien conservée et sont suivi d'un domaine riche en Ser/Pro dans la partie C-terminale, augmentant l'affinité de la DCX pour les MTs (cf. **Figure 46**). Deux paralogues de la DCX (DCLK et DCK2) possèdent en plus un domaine Ser/Thr kinase en C-terminal, similaire à celui de la CaM kinase II (**Fourniol et al., 2013 ; cf. Figure 46**).

Grâce à la reconstitution à basse résolution (~ 30 Å) d'analyses réalisées en microscopie électronique, il a été montré que la DCX ne se lie pas à la *lattice*, mais à l'angle de quatre dimères de tubuline, dans des MTs de treize protofilaments. Son site de liaison est idéalement situé pour stabiliser les contacts latéraux et longitudinaux entre les protofilaments des MTs (**Fourniol et al., 2013 ; cf. Figure 47**).

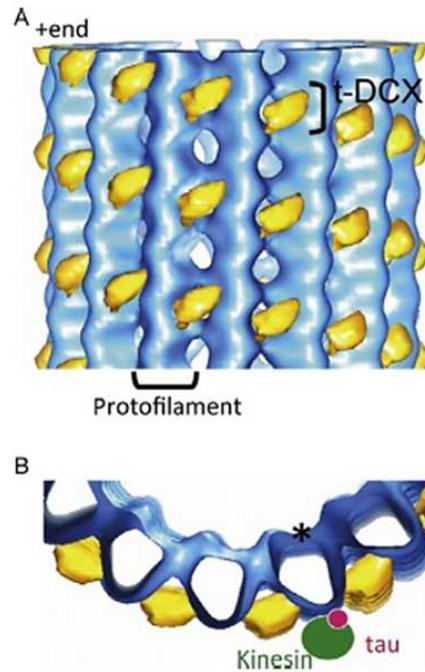


Figure 47 : Mise en évidence dans les microtubules, du site unique de liaison de la DCX (en jaune) entre les protofilaments (en bleu), grâce à la reconstitution à basse-résolution, de la structure en microscopie électronique. **(A)** Vue frontale en 3D, montrant la densité de DCX coincées entre les protofilaments du MT (en bleu). **(B)** Vue au niveau de l'extrémité (+), révélant comment la DCX s'adapte entre les protofilaments. En plus, les sites de liaison au paclitaxel (astérisque), à la kinésine (en vert) et à MAP2/Tau (en rose) sont montrés (**Fourniol et al., 2013**).

A5 – Les protéines CAMSAP/Patronine/Nezha

Ces protéines sont impliquées dans la stabilisation et la dynamique des extrémités (-) des MTs avec qui elles interagissent (**Akhmanova and Hoogenraad, 2015 ; Muroyama and Lechler, 2017 ; cf. Figure 49**).

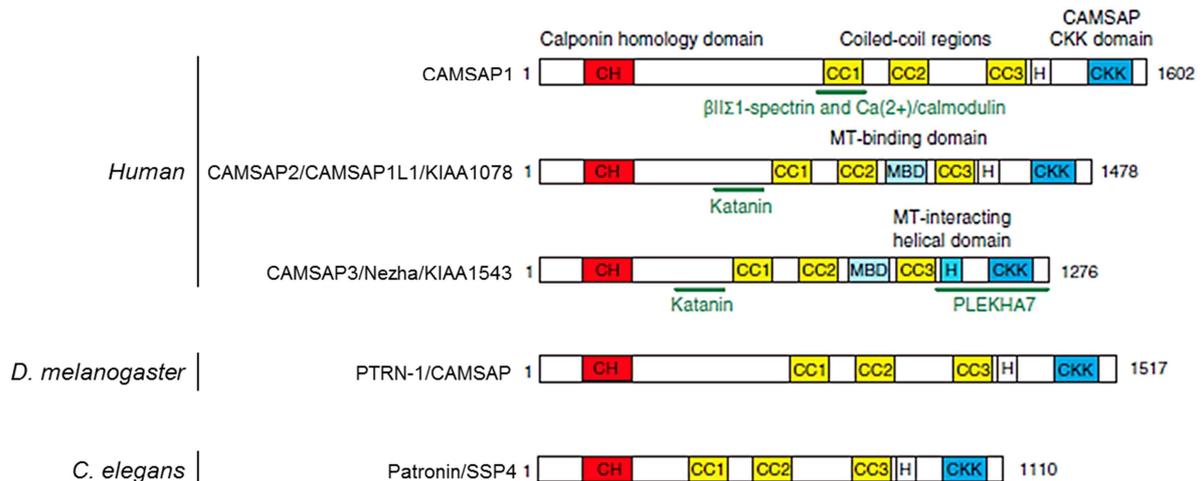


Figure 48 : Structures des membres de la famille CAMSAP/Patronine/Nezha dans différents organismes. Les domaines interagissant avec des protéines partenaires (en vert) sont indiqués par des lignes vertes (**Akhmanova and Hoogenraad, 2015**).

Chez l'homme, trois protéines paralogues des CAMSAPs (*Calmodulin-regulated Spectrin-Associated Proteins*) existent : la CAMSAP1, la CAMSAP2 aussi appelée

CAMSAP1L1 ou KIAA1078 et la CAMSAP3 aussi appelée Nezha ou KIAA1543. En revanche, les invertébrés *D. melanogaster* et *C. elegans* ne possèdent qu'une protéine, Patronine/SSP4 et PTRN-1/CAMSAP, respectivement (Akhmanova and Hoogenraad, 2015 ; cf. Figure 48).

Les membres de la famille CAMSAP/Patronin/Nezha sont caractérisés structurellement par la présence d'un domaine CH (*Calponin Homology*) en N-terminal et d'un domaine CKK (*CAMSAP, KIAA1078 et KIAA1543*) en C-terminal. Le domaine CKK est impliqué dans le ciblage des extrémités (-) des MTs, ainsi que la liaison et/ou la stabilisation des MTs par les CAMSAPs. Au centre des protéines, trois régions *coiled-coil* (CC1, CC2 et CC3) sont prédites. Les protéines CAMSAP2 et CAMSAP3/Nezha possèdent un domaine MBD (Microtubule-Binding Domain) additionnel, localisé entre les régions CC2 et CC3. Ce domaine participe à la liaison et à la stabilisation de la *lattice*, mais ne reconnaît pas l'extrémité (-) des MTs. Tous les membres ont également entre la région CC3 et le domaine CKK, un domaine hélicale (H). Uniquement pour CAMSAP3/Nezha, ce domaine est impliqué dans la stabilisation et l'inhibition de la croissance des extrémités (-) des MTs (Akhmanova and Hoogenraad, 2015 ; cf. Figure 48).

Il est important de noter que le comportement de protection des extrémités (-) des MTs, des trois protéines humaines est différent. CAMSAP1 s'associe seulement transitoirement avec les extrémités (-) des MTs et les suit, tandis que CAMSAP2 et CAMSAP3 se lient stablement à la *lattice* du MT générée lors de la polymérisation à partir de l'extrémité (-) (cf. Figure 49). Via ce processus, la fonction majeure de CAMSAP2/3 est de générer des MTs stabilisés et résistants à la dépolymérisation, en inhibant les catastrophes et la dépolymérisation des extrémités (-) des MTs (Jiang *et al.*, 2014 ; Hendershott and Vale, 2014 ; Akhmanova and Hoogenraad, 2015).

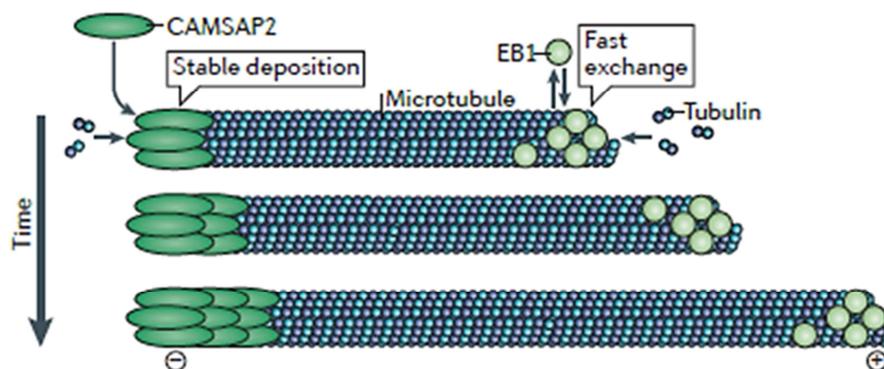


Figure 49 : Dynamique *in vitro* de CAMSAP2 et EB1 au niveau des extrémités en croissance des MTs. CAMSAP2 (comme CAMSAP3) est recrutée sur les extrémités (-) du MT et s'en dissocie lentement, permettant une association à la *lattice* du MT (d'après Akhmanova and Steinmetz, 2015).

De plus, dans divers types cellulaires, ces protéines montrent des localisations et des fonctions différentes. Par exemple, dans les cellules Caco-2, la CAMSAP3/Nezha a originellement été identifiée comme une protéine associée aux jonctions adhérentes, via PLEKHA7, impliquée dans la régulation de l'organisation apico-basale des MTs (Meng *et al.*, 2008). En revanche, CAMSAP2 se localise spécifiquement au niveau des extrémités (-) des MTs non-centrosomaux et les stabilisent. De plus, *in vivo* et *in vitro*, CAMSAP2 est

nécessaire pour l'organisation des MTs dans les neurones, la polarité neuronale, la spécification de l'axone et le développement des dendrites (Yau *et al.*, 2014). De même, PTRN-1 (homologue des CAMSAPs chez *C. elegans*) est impliquée dans l'organisation des MTs dans les neurones (Richardson *et al.*, 2014).

B – Les MAPs déstabilisatrices

Ce sous-groupe de MAPs regroupe des protéines qui sont impliquées dans le désassemblage des MTs, en favorisant les catastrophes et/ou inhibant la polymérisation (van der Vaart *et al.*, 2009). Elles sont regroupées dans deux familles d'ATPases : les kinésines dépolymérisantes et les enzymes protéolytiques des MTs. Ces ATPases couplent l'énergie libérée par l'hydrolyse de l'ATP et le changement de la conformation de la tubuline GTP afin de contrôler la dynamique et donc la longueur des MTs dans les cellules (Bailey *et al.*, 2016). Pour inhiber la polymérisation, ces MAPs peuvent aussi séquestrer les hétérodimères de tubuline, de manière à réduire la quantité de sous-unités disponibles (Jourdain *et al.*, 1997 ; Newton *et al.*, 2004 ; Shipley *et al.*, 2004).

B1 – Les kinésines dépolymérisantes

Les kinésines dépolymérisantes impliquées dans la régulation des MTs sont décrites au §IIIB2 (cf. page 124). Parmi ces protéines on retrouve les membres de la famille des kinésine-13, kinésine-8 et kinésine-14 (Akhmanova and Steinmetz, 2015). Ce sont des dépolymérasés qui utilisent l'énergie libérée par l'hydrolyse de l'ATP pour retirer la coiffe GTP des extrémités des MTs (Bailey *et al.*, 2016), ce qui favorise les catastrophes (Akhmanova and Steinmetz, 2015).

B2 – Les stathmines

Les stathmines sont des régulateurs négatifs de la stabilité des MTs, en interférant sur les catastrophes et la vitesse de polymérisation (van der Vaart *et al.*, 2009 ; cf. Figure 43). Cette famille est spécifiquement impliquée dans la maturation neuronale, la dégénération et les réponses au stress cellulaire (Machado-Neto *et al.*, 2014). Le membre caractéristique de cette famille est une phospho-protéine cytoplasmique de 18 kDa, la stathmine 1, aussi appelée oncoprotéine 18 (Op18), ou LAP18 (*Leukemia-Associated Phosphoprotein p18*). Elle est exprimée de manière ubiquitaire et contribue à la régulation de la prolifération et de la survie cellulaire (Machado-Neto *et al.*, 2014), en régulant le cycle cellulaire (Rubin and Atweh, 2004). Les autres membres de la famille sont la stathmine 2/SCG10 (*Superior Cervical Ganglia*), la stathmine 3/SCLIP (*SCG10-like protein*) et la stathmine 4/RB3 qui présente deux isoformes par épissage alternatif (RB3₀ et RB3₀₀) (Yip *et al.*, 2014 ; cf. Figure 50).

Structurellement, la stathmine 1 possède un domaine de liaison à la tubuline entouré des parties N- et C-terminales. Ce domaine contient deux sites de liaison ayant une affinité identique pour les hétérodimères d' α/β -tubulines (Belmont and Mitchison, 1996). Dans la partie C-terminale, les régions en hélice- α sont nécessaires et suffisantes pour la formation d'un complexe stathmine/tubuline stable (Steinmetz, 2007). Toutes les stathmines ont une région promotrice de catastrophe (domaine stathmin *like*), qui contient quatre sérines phosphorylables (cf. page 134) et le domaine de liaison à la tubuline (Machado-Neto *et al.*, 2014 ; cf. Figure 50).

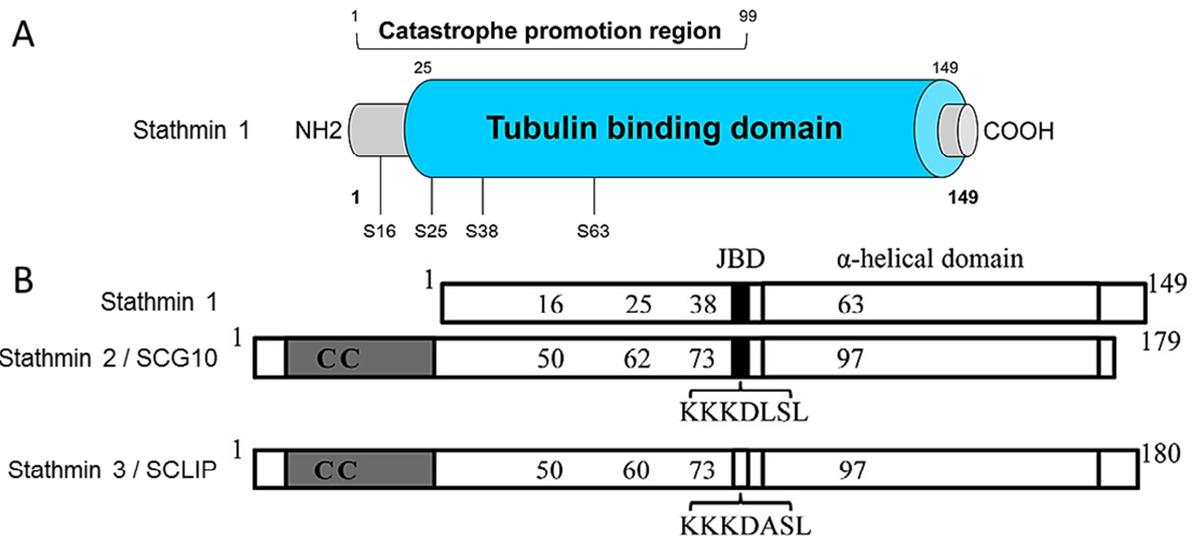
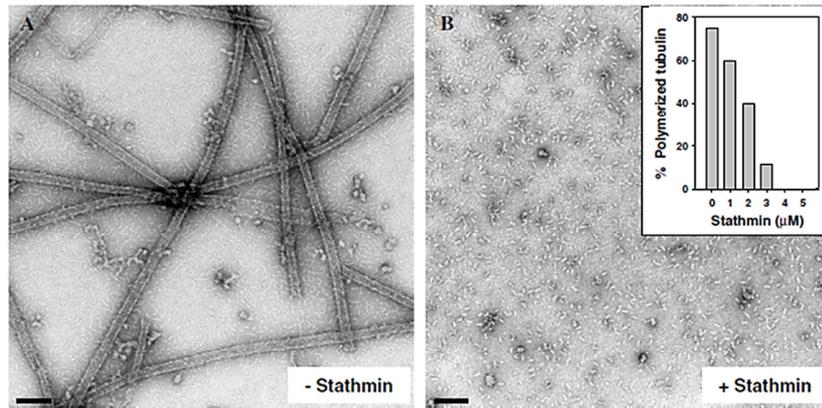


Figure 50 : Structure des stathmines. (A) Structure de la stathmine 1 mettant en évidence son domaine de liaison à la tubuline et sa région (*stathmine-like*) promotrice des catastrophes contenant quatre sites de phosphorylation (Ser16, Ser25, Ser38 et Ser63) (Machado-Neto *et al.*, 2014). (B) Représentation des membres de la famille des stathmines, avec leurs sites de phosphorylation et le domaine JBD (*JNK Binding Domain*) contenant les lysines potentiellement impliquées dans les interactions avec la kinase. Les régions en hélice- α sont représentées en blanc, et les extensions N-terminales de SCG10 et SCLIP sont en grises (Yip *et al.*, 2014).

La fonction principale de la stathmine 1 est de déstabiliser les MTs, en favorisant les événements de catastrophe, ou la séquestration des hétérodimères d' α/β -tubulines, empêchant l'incorporation de ses dernières dans les protofilaments et donc la formation des MTs (Steinmetz *et al.*, 2000 ; Steinmetz *et al.*, 2007 ; Rubin and Atweh, 2004 ; Machado-Neto *et al.*, 2014 ; cf. Figure 51) La stathmine favorise les catastrophes en induisant une conformation courbée des sous-unités de tubuline (Belmont and Mitchison, 1996 ; Howell *et al.*, 1999 ; Manna *et al.*, 2006). Elle peut induire des catastrophes au niveau des extrémités (+) et (-), mais son activité promotrice de catastrophes est plus forte au niveau des extrémités (-) (Manna *et al.*, 2006). Lors de l'interphase, l'inactivation de la stathmine conduit à une intense polymérisation des MTs et augmente la densité microtubulaire (Howell *et al.*, 1999 ; Sellin *et al.*, 2008).



Stathmin in Cell-Cycle Progression

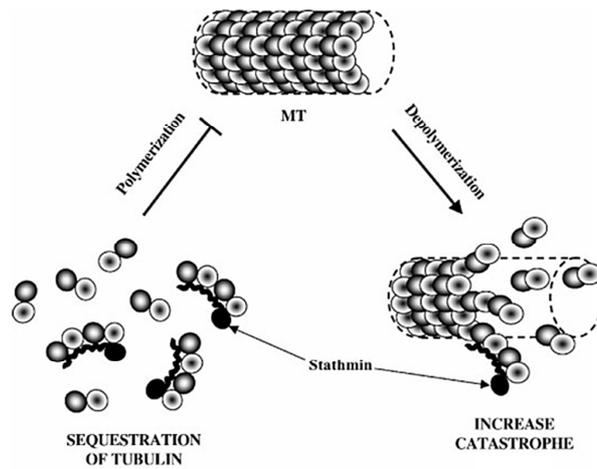


Figure 51 : Rôle de la stathmine dans la régulation de la dynamique des microtubules. (A-B) Observation au microscope électronique à transmission (A) des microtubules polymérisés *in vitro*, (B) l'effet déstabilisateur de la stathmine sur la préparation microtubulaire montré en A (Steinmetz, 2007). (C) Modèle montrant la stathmine inhibant la polymérisation en séquestrant les sous-unités de tubuline, ou augmentant la dépolymérisation des microtubules en induisant un changement conformationnel (Rubin and Atweh, 2004).

Une corrélation entre l'expression de la stathmine et la prolifération cellulaire a été remarquée, avec la surexpression et l'inhibition de l'expression de la stathmine conduisant à l'arrêt du cycle cellulaire (Rubin and Atweh, 2004). Dans ce sens, la surexpression de la stathmine 1 a été identifiée dans des cellules hématopoïétiques malignes et lors de l'inhibition de la stathmine 1 le potentiel hautement prolifératif des cellules leucémiques est réduit. Ces données mettent en évidence que la stathmine est retrouvée impliquée dans la cancérogenèse (Machado-Neto *et al.*, 2014). Néanmoins, les souris déficientes en stathmine sont viables, suggérant que la stathmine n'est pas indispensable pour le développement des mammifères. Cependant, les souris adultes montrent des défauts neurologiques (Schubart *et al.*, 1996).

B3 – Les enzymes protéolytiques des MTs

Ces enzymes de coupure des MTs retirent les dimères de tubuline dans le polymère, créant ainsi de nouvelles extrémités (cf. Figure 52). Trois types d'enzymes protéolytiques sont connus : la katanine, la spastine et la fidgetine. Elles appartiennent toutes à la famille des AAA+ (ATPase Associated with various cellular Activities) (Bailey *et al.*, 2016).

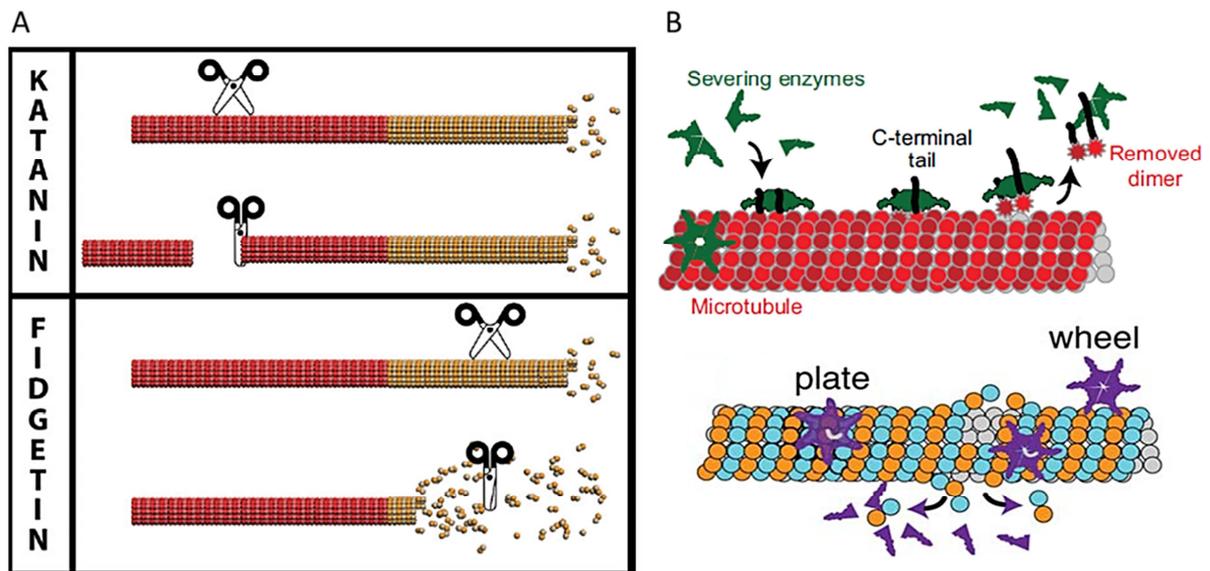


Figure 52 : Activité catalytique des enzymes protéolytiques des microtubules. (A) Les enzymes protéolytiques (ciseaux) qui coupent les microtubules dans une région stable (en rouge) conduisent à l'augmentation de leur nombre, tandis que les enzymes qui coupent dans une région labile (en jaune) engendrent la dépolymérisation des microtubules. La katanine (et la spastine non montré) coupent préférentiellement les régions stables, alors que la fidgetine coupe préférentiellement les régions labiles (Bass, 2014). (B) Processus moléculaire de coupeure des microtubules avec les enzymes protéolytiques hexamériques AAA (en vert ou violet) assemblées autour de la queue C-terminale (ligne noire) des dimères de tubuline (ronds rouge ou bleu et orange). Le domaine AAA catalytique utilise l'énergie de l'hydrolyse de l'ATP afin de déformer et libérer les dimères de tubuline de la *lattice* des microtubules, du fait de la perte de leurs interactions inter-dimères (d'après Sharp and Ross, 2012 ; Bailey *et al.*, 2016).

L'activité de coupeure des MTs de la katanine a tout d'abord été découverte dans des extraits d'œuf de Xénope, dans lesquels les MTs étaient détériorés. Elle coupe les MTs dans leur *lattice*, au niveau de régions stables (Bass, 2014). L'analyse de la séquence de la protéine a permis de révéler un dimère constitué de deux sous-unités p60 et p80, de 60 et 80 kDa respectivement (Vale, 1991). La p60 contient l'activité catalytique via son domaine AAA et la p80 contient des motifs WD répétés permettant le ciblage de la sous-unité catalytique sur des régions cellulaires spécifiques. La sous-unité p60 est capable de couper les MTs *in vitro* indépendamment de la p80 (Bailey *et al.*, 2016).

La spastine a été découverte comme une protéine qui est fréquemment mutée dans la HSP (*Hereditary Spastic Paraplegie*), une maladie neuromusculaire de l'adulte (Hazan *et al.*, 1999). Comme la katanine, la spastine coupe préférentiellement les régions stables dans la *lattice* des MTs (Bass, 2014). La spastine possède également un domaine AAA nécessaire pour l'activité protéolytique, un domaine MTBD assurant la liaison aux MTs, un domaine MIT (*Microtubule Interacting and Trafficking*) nécessaire pour l'interaction avec d'autres protéines, et un domaine HD (*Hydrophobic Domain*) transmembranaire nécessaire pour interagir avec les organites (Lumb *et al.*, 2012 ; Sharp and Ross, 2012 ; cf. Figure 53). Chez les mammifères, une forme tronquée de la spastine existe, pour laquelle il manque les quatre-vingt-sept premiers acides aminés contenant le domaine de liaison à la membrane. Quand cette protéine est exprimée dans les cellules ou reconstituée *in vitro*, elle est capable de couper des MTs stabilisés avec du paclitaxel (Vale, 1991).

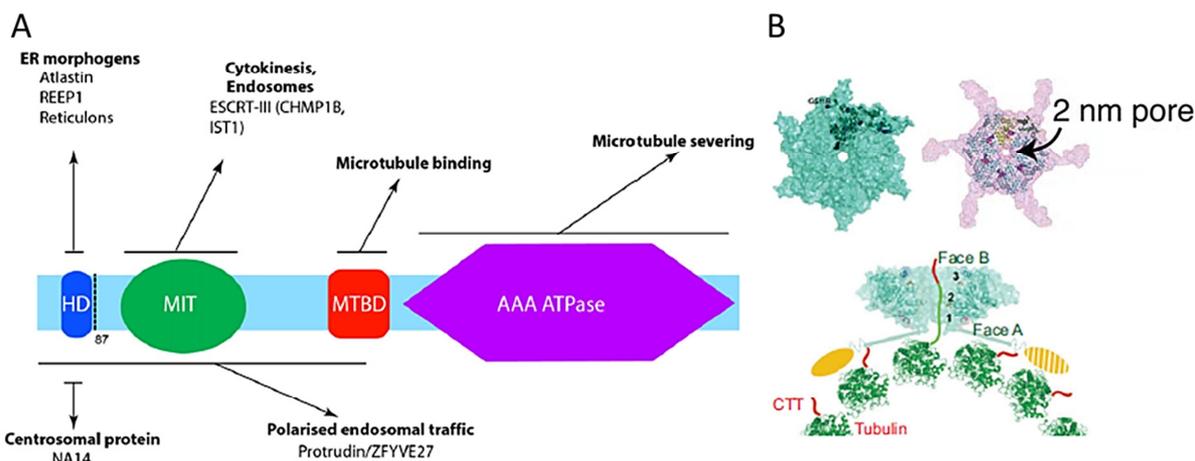


Figure 53 : Structure primaire et tertiaire de la spastine. (A) Organisation de ses domaines fonctionnels (HD : *Hydrophobic Domain* ; MIT : *Microtubule Interacting and Trafficking* ; MTBD : *MT Binding Domain* ; et AAA ATPase) (Lumb *et al.*, 2012). (B) Structure tridimensionnelle d'un hexamère de spastine résolue en 2008. Le pore central de 2nm correspond au site catalytique permettant la coupure des MTs en interagissant avec la queue C-terminale de la tubuline (Sharp and Ross, 2012 ; Bailey *et al.*, 2016).

La fidgetine a été découverte dans les années 1940, mais sa séquence peptidique a été analysée en 2000 chez des souris irradiées possédant des mutations aléatoires. Cette analyse a mis en évidence la présence d'un domaine enzymatique AAA, ressemblant aux autres enzymes protéolytiques impliquées dans le développement (Cox *et al.*, 2000 ; Bailey *et al.*, 2016). La fidgetine coupe préférentiellement les MTs au niveau de leurs extrémités qui sont des régions dynamiques (Bass, 2014). Cependant, *in vitro*, il a été montré que la fidgetine recombinante humaine coupe des MTs stabilisés avec du Taxol® dans leur *lattice*, favorisant ainsi leur dépolymérisation. Dans les cellules, la fidgetine humaine cible les centrosomes et supprime la croissance et l'attachement des MTs à partir de ces derniers (Mukherjee *et al.*, 2012).

II – Régulation de la dynamique des microtubules par les protéines +TIPs (*plus-end Tracking Proteins*)

Les protéines +TIPs (*plus-end Tracking Proteins*) appartiennent en majorité aux MAPs structurales et ont la particularité de s'associer aux extrémité (+) en croissance des MTs (Ferreira *et al.*, 2014 ; Schuyler and Pellman, 2001). Ces MAPs spécialisées sont conservées dans tous les eucaryotes, où elles s'accumulent et régulent spécifiquement les extrémités (+) des MTs en croissance (Schuyler and Pellman, 2001 ; Akhmanova and Hoogenraad, 2005). Ainsi, les +TIPs forment des comètes au bout des MTs, suivant la croissance des MTs et se dissocient des MTs quand ceux-ci dépolymérisent (Howard and Hyman, 2003 ; cf. Figure 54). Ce groupe de MAPs est fortement diversifié, car il inclut des moteurs moléculaires, ainsi que des protéines non-motrices (Akhmanova and Hoogenraad, 2005). Diverses +TIPs ont pu être découvertes grâce à l'apparition de l'étiquette protéique GFP (*Green Fluorescent Protein*) et la sophistication des technologies d'imagerie (Galjart, 2005 ; cf. Figure 54-A). Le premier membre connu appartenant à la famille des +TIPs est la

protéine CLIP-170 (*Cytoplasmic Linker Protein of 170 kDa*) (Perez *et al.*, 1999 ; cf page 138). Depuis, plus de vingt +TIPs différentes ont été identifiées (Tamura and Draviam, 2012 ; Grimaldi *et al.*, 2015 ; Nogales and Zhang, 2016).

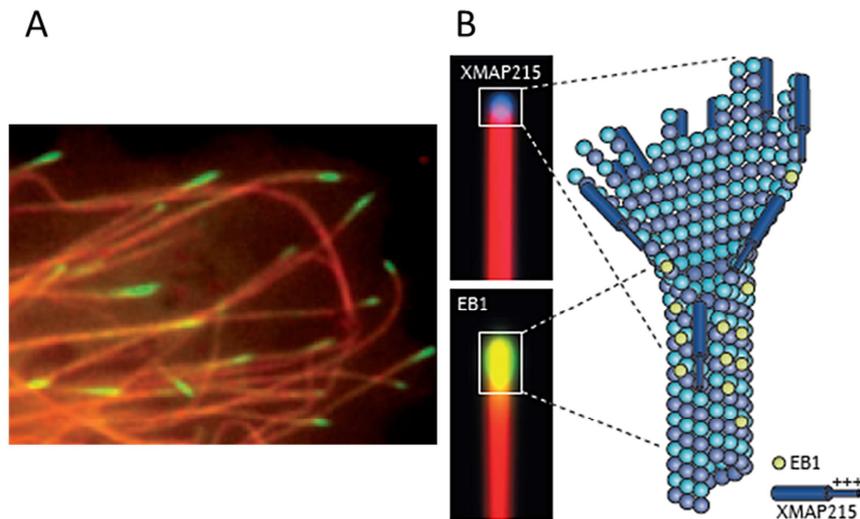


Figure 54 : Localisation de certaines +TIPs au niveau des extrémités (+) des MTs en croissance. (A) Image de vidéomicroscopie montrant la localisation au niveau des extrémités (+) des MTs (en rouge), de la +TIP EB3 (en vert) dans des fibroblastes humains, vivants surexprimant mCherry- α -tubuline et EB3-GFP (Akhmanova and Steinmetz, 2010). (B) Accumulation de XMAP215 et EB1 dans les extrémités (+) des MTs en croissance. XMAP215 (en bleu) se lie au niveau des extrémités distales, tandis que EB1 (en jaune) s'accumule dix nanomètres plus loin des bouts les plus externes (Akhmanova and Steinmetz, 2015).

Les +TIPs sont majoritairement impliquées dans la régulation de l'instabilité dynamique, dont nous nous sommes plus particulièrement intéressés dans cette étude, mais aussi dans la création d'interactions avec d'autres composants cellulaires. Du fait de leurs diverses fonctions, les +TIPs sont essentielles dans plusieurs organismes et systèmes cellulaires (Galjart, 2005 ; Akhmanova and Steinmetz, 2010 ; Akhmanova and Steinmetz, 2015 ; cf. Figures 55 et 56).

Les +TIPs présentent d'importantes fonctions dans la régulation du comportement dynamique des MTs (Akhmanova and Steinmetz, 2008 ; Akhmanova and Steinmetz., 2010 ; Larti *et al.*, 2015 ; Akhmanova and Steinmetz, 2015). Effectivement, la localisation de ces protéines au niveau des extrémités (+) des MTs en croissance est un site idéal pour contrôler différents aspects de la dynamique des MTs. Tout d'abord, certaines +TIPs stimulent la croissance des MTs, en catalysant l'addition de sous-unités de tubuline aux bouts des MTs. De plus, ces +TIPs peuvent aussi favoriser l'élongation des MTs en se liant à la *lattice* de ces derniers et à de la tubuline soluble. C'est le cas pour XMAP215 et EB1 (Kinoshita *et al.*, 2001 ; Brouhard *et al.*, 2008 ; Komarova *et al.*, 2009 ; Zanic *et al.*, 2013 ; cf. Figure 55). D'autres +TIPs favorisent les événements de sauvetage, comme par exemple CLIP-170 et CLASP (Komarova *et al.*, 2002a ; Mimori-Kiyosue *et al.*, 2005 ; cf. Figure 55). Lors de la migration cellulaire, cette fonction promotrice des sauvetages est d'autant plus importante car elle peut réorienter le réseau microtubulaire. Les +TIPs régulent également le désassemblage ou les événements de catastrophe des MTs, via MCAK/KIF2C de la famille de la kinésine-13 (Shipley *et al.*, 2004 ; cf. Figure 55). Enfin, plusieurs +TIPs sont impliquées dans la stabilisation des MTs, notamment en les connectant à la périphérie cellulaire (Gundersen *et*

al., 2004 ; Akhmanova and Hoogenraad, 2005 ; Akhmanova and Steinmetz, 2010). Par exemple, au niveau du cortex cellulaire, les +TIPs, CLASP (Akhmanova *et al.*, 2001 ; Mimori-Kiyosue *et al.*, 2005), CLIP-170 (Fukata *et al.*, 2002), EB1 (Wen *et al.*, 2004), APC (Etienne-Manneville and Hall, 2003 ; Wen *et al.*, 2004), ou encore MACF1 (*Microtubule Actin Crosslinking Factor 1/ACF7 : Actin Crosslinking Family 7*) (Kodama *et al.*, 2003) agissent comme des facteurs de sauvetage et de stabilisation des MTs (van der Vaart *et al.*, 2009 ; Galjart, 2010 ; cf. Figure 55).

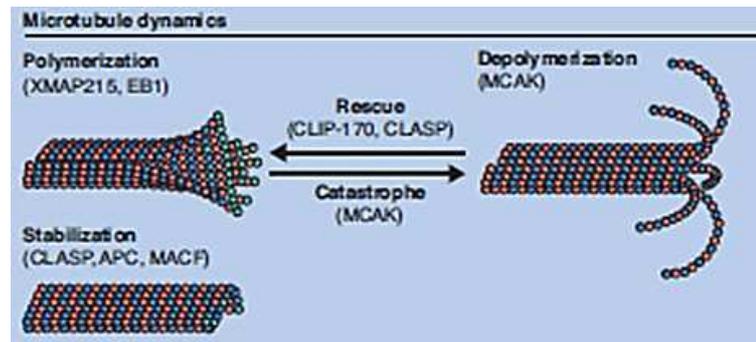


Figure 55 : Rôles des +TIPs dans la modulation de la dynamique des MTs (d'après Akhmanova and Steinmetz, 2010).

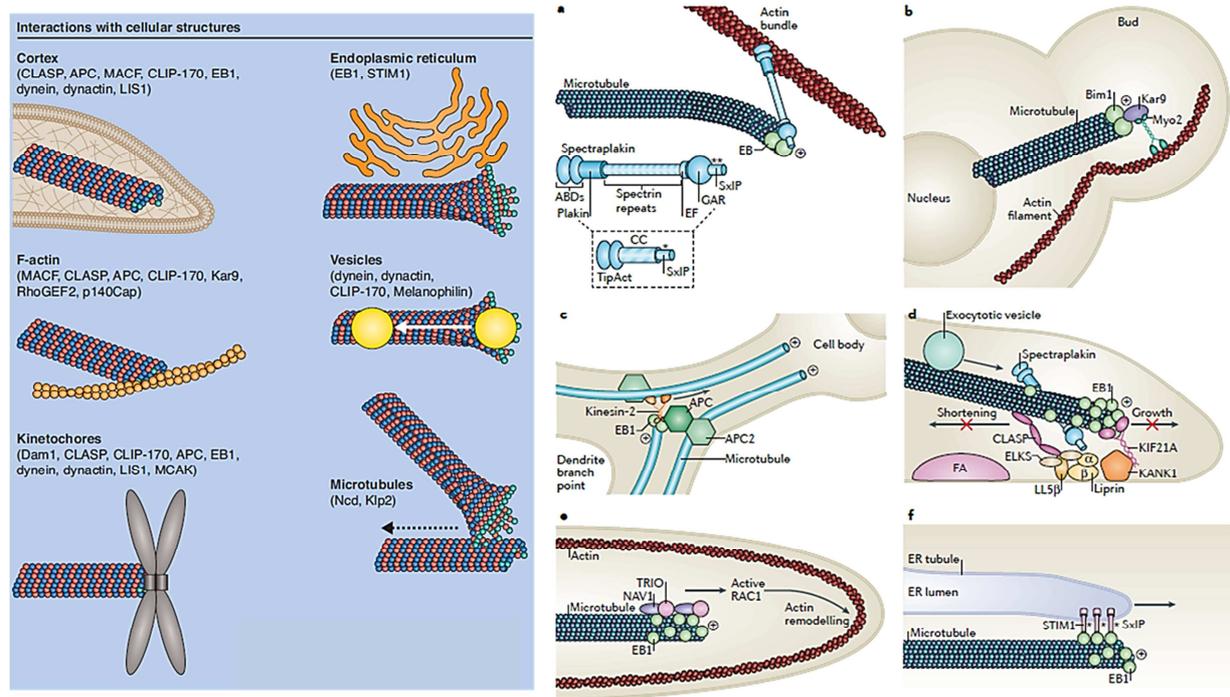
En plus de leur action dans la régulation de la dynamique des MTs, les +TIPs ont aussi un rôle de lien entre les MTs et différentes structures intracellulaires, comme les membranes cellulaires, le cytosquelette d'actine, les adhésions focales et les kinétochores (Akhmanova and Hoogenraad, 2005 ; Akhmanova and Steinmetz, 2010 ; Galjart, 2010).

Les +TIPs prennent part au transport rétrograde assuré par le complexe dynéine/dynactine le long des MTs, en favorisant le chargement des cargaisons (organites membranaires par exemple) sur les protéines motrices au niveau des extrémités (+) des MTs. Par exemple, CLIP-170 va pouvoir initier ce type de transport (dirigé vers l'extrémité (-)), en interagissant avec la sous-unité de la dynactine, p150^{Glued} dans les cellules en interphase (Vaughan *et al.*, 2002 ; Lomakin *et al.*, 2009 ; cf. Figure 56). Certaines +TIPs sont aussi impliquées dans le remodelage du réticulum endoplasmique (RE). En effet, la +TIP STIM1 (*Stromal Interaction Molecule 1*) en se liant à EB1 stimule l'extension du RE de manière dépendante des MTs (Grigoriev *et al.*, 2008 ; cf. Figure 56).

Les +TIPs peuvent former un lien entre les extrémités des MTs et les composants du cortex cellulaire via des interactions directes, ou indirectes avec le cytosquelette d'actine, assurant la stabilisation des extrémités (+) des MTs à la périphérie cellulaire (Gundersen *et al.*, 2004 ; Akhmanova and Hoogenraad, 2005 ; Akhmanova and Steinmetz, 2010 ; cf. Figure 56). A l'inverse, CLIP-170 se lie à mDia1/formin via son motif FEED-like dans (Lewkowicz *et al.*, 2008), le complexe ainsi formé est recruté au niveau des extrémités (+) via EB1 et accélère l'élongation des filaments d'actine en restant attaché à la surface des MTs (Henty-Ridilla *et al.*, 2016). De plus, les spectraplakines, tel que MACF1 sont importantes pour renforcer le lien entre les MTs et les filaments d'actine polarisés, notamment via le complexe CLASP/LL5 β (Kodama *et al.*, 2003 ; Lansbergen *et al.*, 2006 ; Drabek *et al.*, 2006 ; cf. Figure 56). De plus, certaines +TIPs (APC, MACF1 et CLASP) participent au contrôle de la dynamique des adhésions focales (FAs), en stabilisant les nouvelles FAs, en

guidant la croissance des MTs, via l'interaction avec les fibres de stress d'actine, vers les FAs, ou en stabilisant les MTs à côté des FAs matures respectivement (Stehbens and Wittman, 2012).

Des +TIPs sont également nécessaires pendant le cycle cellulaire, où elles participent à l'attachement des MTs aux kinétochores pendant la mitose (Galjart, 2005 ; Akhmanova and Steinmetz, 2015 ; cf. Figure 56). C'est le cas pour le complexe dynéine/dynactine et CLIP-170 en interagissant avec LIS1 (Tai *et al.*, 2002), ainsi que CLASP (Maffini *et al.*, 2009 ; Maia *et al.*, 2012).



A – La famille des protéines EBs

Dans les cellules en interphase et mitotiques, les protéines EBs (*End Binding proteins*) s'associent directement et spécifiquement avec les extrémités (+) des MTs en croissance et interagissent avec de nombreuses autres +TIPs (Akhmanova and Steinmetz, 2010 ; Mustyatsa *et al.*, 2017).

Les protéines EB font partie d'une famille hautement conservée, contenant chez les mammifères trois membres (EB1, EB2/RP1 et EB3/EB3F) codés par trois gènes différents (*MAPRE1*, *MAPRE2* et *MAPRE3*) (Su and Qi, 2001). EB1 a été le premier membre identifié lors d'une étude en double-hybride chez la levure. Il a été trouvé comme interagissant avec la partie C-terminal du suppresseur de tumeurs APC (*Adenomatous Polyposis Coli*) (Su *et al.*, 1995). Les protéines EB1 et EB3 sont plutôt ubiquitaires, tandis que l'expression d'EB2 n'est retrouvée que dans certains types cellulaires et tissus (Su and Qi, 2001). Généralement, EB1 est fortement exprimée par rapport aux autres EBs. EB3 est également hautement exprimée mais dans des types cellulaires spécifiques (Ferraira *et al.*, 2014). L'expression d'EB3 a d'abord été identifiée dans les neurones, où elle a été montrée comme interagissant avec une forme spécifique du cerveau d'APC (APC2 : *Adenomatous Polyposis Coli* 2). Mais, ensuite

EB3 a aussi été trouvée fortement exprimée dans les cellules musculaires (Nakagawa *et al.*, 2000 ; Straube and Merdes, 2007).

A1 - Structure des protéines EBs

Les protéines EBs sont relativement petites (environ 32 kDa), allongées avec des caractéristiques structurales conservées. Tous les membres possèdent une région liant les extrémités (+) en croissance des MTs en N-terminal contenant un domaine CH (*Calponin Homology*) (Hayashi and Ikura, 2003 ; Akhmanova and Steinmetz, 2008 ; Komarova *et al.*, 2009 ; cf. Figure 57). La partie C-terminale contient une région *coiled-coil* qui est nécessaire pour la dimérisation (Su and Qi, 2001 ; cf. Figure 57). Cette dimérisation est essentielle du fait que les protéines EBs ont besoin de deux domaines CH pour se lier aux MTs, mais aussi pour former un domaine C-terminal fonctionnel (Honnappa *et al.*, 2005 ; Buey *et al.*, 2011). La région *coiled-coil* chevauche partiellement le domaine EBH (*End Binding Homology*) (cf. Figure 57), qui est nécessaire et suffisant pour permettre l'interaction avec les partenaires des protéines EBs contenant un motif SxIP (cf. page 92) (Akhmanova and Steinmetz, 2008). De plus, dans la partie C-terminale, EB1 possède un motif EEY/F, semblable à celui trouvé dans l' α -tubuline (Komarova *et al.*, 2005 ; Weisbrich *et al.*, 2007 ; cf. Figure 57), qui est important pour la régulation de l'association d'EB1 avec des protéines ayant un domaine CAP-Gly, telles que CLIP-170 et p150^{Glued} (Mishima *et al.*, 2007 ; Bieling *et al.*, 2008).

On notera que la protéine EB2 a un domaine N-terminal plus long que les autres EBs, ainsi qu'un domaine C-terminal contenant moins de résidus acides (cf. Figure 57). Ces différences structurales sont responsables de différentes fonctions, comme nous allons le voir ci-après (Komarova *et al.*, 2009).

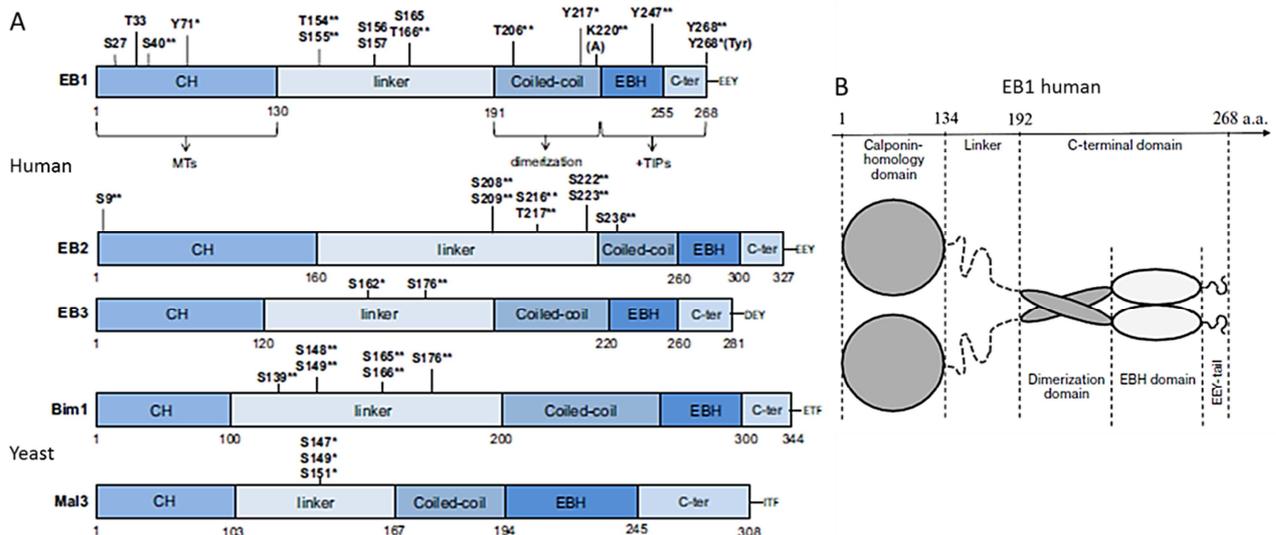


Figure 57 : Structure des protéines EBs. (A) Domaines fonctionnels des protéines EBs humaines et de levure, avec les acides aminés subissant les modifications post-traductionnelles (Nehlig *et al.*, 2017). (B) Structure schématique de la protéine EB1 humaine (Mutstyatsa *et al.*, 2017) (CH : *Calponin Homology* ; EBH : *End Binding Homology* ; EEY/F : motif peptidique Glu-Glu-Tyr/Phe).

A2 – EB et le réseau de +TIPs

Les protéines EBs sont le corps du réseau des +TIPs en assurant des interactions avec d'autres +TIPs possédant des motifs SxIP, CAP-Gly ou LxxPTPh.

A2a - Les motifs SxIP

De manière générale, le petit oligopeptide, SxIP (sérine ou thréonine – autre acide aminé – isoleucine ou leucine et proline) représente un signal majeur de localisation des +TIPs aux extrémités (+) des MTs, MtLS (*Microtubule tip-Localization Signal*), en reconnaissant spécifiquement le domaine EBH en C-terminal des protéines EBs (**Bu and Su, 2003** ; **Honnappa et al., 2009** ; **Jiang et al., 2012** ; **Kumar and Wittmann, 2012**). Cette interaction permet donc la localisation indirecte de certaines +TIPs aux bouts (+) des MTs (**Lansbergen and Akhmanova, 2006**). Le motif SxIP est généralement incorporé dans des régions peptidiques non structurées, positivement chargées du fait de l'enrichissement en prolines, sérines et en acides aminés basiques (**Honnappa et al., 2009**). D'autres analyses bioinformatiques ont permis de montrer que le motif SxIP est entouré de neuf acides aminés qui ne sont pas acides et au moins un acide aminé basique présent parmi les quatre premiers acides aminés précédant le motif (**Jiang et al., 2012**).

Le motif SxIP a été initialement montré comme étant impliqué dans l'interaction avec EB, lors de l'étude de l'interaction entre APC et EB1 (**Honnappa et al., 2005**). Depuis, plusieurs études ont montré que des +TIPs, telles que MCAK, CLASPs, APC, MACF1, STIM1 et SLAIN1/2 ont un motif SxIP similaire (**Akhmanova and Steinmetz, 2010**).

A2b – Les domaines CAP-Gly

Les domaines CAP-Gly (*Cytoskeletal-Associated Protein Glycine-rich*) de certaines +TIPs leur permettent d'interagir avec les extrémités (+) des microtubules ou avec d'autres protéines (cf. **page 112**). Ces domaines globulaires sont des motifs riches en glycines et conservés chez les eucaryotes, pouvant être présents en une ou de multiples copies. Ils ont été décrits au départ dans des protéines capables d'interagir avec la tubuline (**Pierre et al., 1992** ; **Pierre et al., 1994**), de différentes espèces (**Riehemann and Sorg., 1993**).

La structure cristallographique du domaine CAP-Gly de la protéine F53F4.3 (une protéine chaperonne spécifique de la tubuline) de *C. elegans*, a permis de révéler la structure tridimensionnelle de ce domaine (**Li et al., 2002**). Les auteurs ont mis en évidence qu'à l'intérieur du domaine CAP-Gly, il y a une séquence conservée, GKNDG (Glycine-Lysine-Asparagine-Aspartate-Glycine), et que les séquences adjacentes à cet oligopeptide sont impliquées dans la modulation de l'affinité du domaine entier pour les MTs (**Li et al., 2002**). De ce fait, il est important de noter que les domaines CAP-Gly sont entourés de séquences riches en sérines, comme c'est le cas pour CLIP-170. Ces données de cristallographie ont également permis de montrer que le domaine CAP-Gly ne se lie pas uniquement à la tubuline, mais qu'il peut se lier à d'autres protéines, notamment EB1 via son motif EEY/F (**Li et al., 2002**). La structure tridimensionnelle du domaine CAP-Gly de la sous-unité p150^{Glued} de la dynactine de mammifère a aussi été déterminée, identifiant également la séquence GKNDG, ainsi qu'une certaine plasticité conformationnelle et d'interactions avec EB1 (**Yan et al., 2013**). De manière générale, ces domaines sont nécessaires pour interagir avec EB1 et/ou la

tubuline (Pierre *et al.*, 1992 ; Weisbrich *et al.*, 2007), tandis que les régions basiques aident la liaison aux MTs (Hoogenraad *et al.*, 2000).

A2c - Les motifs LxxPTPh

Le motif LxxPTPh a été identifié à partir d'une étude menée sur la +TIP, Kar-9 (*Karyogamy protein 9*, homologue d'APC chez la levure bourgeonnante *S. cerevisiae*). Cette protéine contient un domaine SxIP-like et un motif SxIP canonique, dans sa partie C-terminale, qui lie le domaine EBH, en C-terminal de Bim1 (protéine homologue à EB) (Manatschal *et al.*, 2016). Cependant, la mutation de ces deux motifs n'empêche pas Kar-9 de se lier à Bim1 et aux extrémités (+) des MTs (Manatschal *et al.*, 2016), suggérant une autre région capable d'assurer cette fonction. En combinant des approches biochimiques, biophysiques, ainsi que de biologie cellulaire et structurales, ce nouveau motif de liaison à EB (LxxPTPh) a été caractérisé dans la partie C-terminale de Kar-9 (Kumar *et al.*, 2017). Dans le motif LxxPTPh, les x correspondent à n'importe quel acide aminé et le h correspond à un acide aminé hydrophobe. De plus, comme le motif SxIP, ce motif peut aussi lier le domaine EBH dans la partie C-terminale des protéines EBs (Kumar *et al.*, 2017). Les motifs LxxPTPh ont été découverts dans d'autres +TIPs (SLAIN1, TACC1, MACF1 et Dis1/TOG ; cf. Figure 58) et dans plusieurs organismes, ce qui suggère que cet élément de liaison à EB, est une caractéristique générale des +TIPs, au même titre que les motifs SxIP ou les domaines CAP-Gly (Kumar *et al.*, 2017).

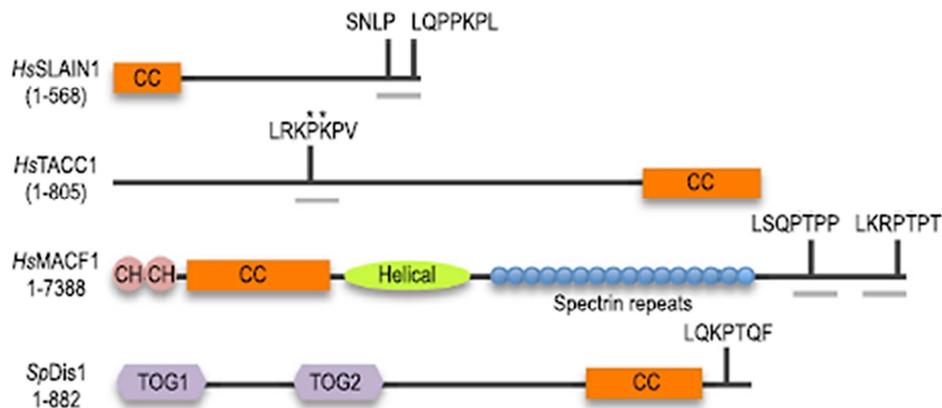


Figure 58 : Localisation des motifs LxxPTPh trouvés dans Kar-9, dans SLAIN1, TACC1 (*Transforming Acidic Coiled-Coil*) et MACF1 (*Microtubule Actin Crosslinking Factor 1*) humaines et Dis1 de la levure (*S. pombe*). Les barres grises représentent les motifs LxxPTPh (d'après Kumar *et al.*, 2017).

A3 – Fonctions des protéines EBs dans la dynamique des microtubules

Les protéines EBs humaines ont tout d'abord été montrées impliquées *in vivo* dans l'acétylation des faisceaux de MTs résistants au nocodazole (Bu and Su, 2001).

Dans les cellules, les protéines EBs rendent les MTs plus dynamiques. Les protéines EBs (EB1 et EB3) et l'homologue chez la levure à fission (Mal3), favorisent une croissance microtubulaire persistante, en supprimant les catastrophes, sûrement en contrecarrant l'activité de dépolymérase, comme la +TIP MCAK (Busch and Brunner, 2004 ; Komarova *et al.*, 2009). En revanche, EB2 n'est pas impliquée dans ces fonctions de régulation de la dynamique des MTs (Komarova *et al.*, 2005 ; De Groot *et al.*, 2009 ; Komarova *et al.*, 2009).

Par ailleurs, il a été montré que dans des systèmes *in vitro*, les protéines EBs peuvent promouvoir la vitesse de polymérisation des MTs (**Coquelle et al., 2009 ; Komarova et al., 2009 ; Zanic et al., 2013**), possiblement en modulant la structure des extrémités des MTs (**Maurer et al., 2014**). Cette activité promotrice de la croissance microtubulaire des protéines EBs a été retrouvée dans différents organismes, tels que les levures (**Beinhauer et al., 1997 ; Tirnauer et al., 1999 ; Nakamura et al., 2001**), la drosophile (**Rogers et al., 2002 ; Li et al., 2012**) et les cellules humaines (**Komarova et al., 2009**).

Dans les cellules en interphase, l'impact des protéines EBs sur la dynamique des MTs implique leurs interactions avec les autres +TIPs (**Ferreira et al., 2014**). Par exemple, les protéines EB1 et EB3 restaurent l'association de CLIP-170 avec les extrémités (+) des MTs (**Komarova et al., 2005 ; Dixit et al., 2009**). En effet, *in vitro* EB1 peut coopérer avec d'autres +TIPs, comme CLIP-170 (cf. **page 138**), pour réguler la coiffe de tubuline-GTP (cf. **page 29**) (**Lopus et al., 2012**). De plus, au niveau du cortex cellulaire, EB1 s'associe avec les CLASPs (*Cytoplasmic Linker protein (CLIP)-Associated Proteins* ; cf. **page 98**) et affecte aussi la dynamique des MTs, en augmentant les événements de sauvetages (**Mimori-Kiyosue et al., 2005**). EB1, comme APC interagit également avec une protéine d'échafaudage du cytosquelette d'actine, mDia/formin, induisant la stabilisation des MTs et la migration cellulaire (**Wen et al., 2004**). Les protéines EBs interagissent aussi avec des protéines dépolymérisantes, comme MCAK (*Mitotic Centromere-Associated Kinesin* ; cf. **page 125**) au niveau des bouts (+) des MTs. Cette interaction est importante pour la localisation de MCAK aux extrémités (+) des MTs (**Moore et al., 2005 ; Montenegro Gouveia et al., 2010**). De plus, les protéines EBs peuvent promouvoir *in vitro* la catastrophe des MTs, en réduisant la taille de la coiffe GTP stabilisatrice. Pour cela, elles se lient sur la coiffe GTP et accélèrent l'hydrolyse du GTP lié à la tubuline (**Maurer et al., 2011**). De manière générale, EB2 n'interagit pas dans la même mesure que les autres EBs avec MCAK, APC ou CLIP-170 (**Bu and Su, 2003 ; Komarova et al., 2005 ; Lee et al., 2008**). Ainsi, en permettant l'accumulation de protéines stabilisatrices ou déstabilisatrices aux extrémités (+) des MTs, les protéines EBs facilitent la transition rapide entre la polymérisation et la dépolymérisation des MTs (**Ferreira et al., 2014**).

A4 - Localisation subcellulaires des protéines EBs

En plus de leur localisation aux bouts (+) des MTs, les protéines EBs peuvent se lier directement à d'autres structures cellulaires, comme le centrosome. En effet, EB1 est un composant fonctionnel du centrosome et se lie à cette structure indépendamment des MTs via son domaine C-terminal (**Louie et al., 2004**). Plus précisément, l'interaction d'EB1 avec la protéine centrosomale FOP (*FGFR1 Oncogene Partner*) est essentielle à ce recrutement (**Yan et al., 2006**). La protéine EB3 localise également au niveau du centrosome (**Bu and Su, 2001 ; Su and Qi, 2001 ; Ban et al., 2009**). Les protéines EBs peuvent aussi interagir indirectement avec les membranes ou les filaments d'actine. Effectivement, une étude a montré qu'EB1 co-localise avec les filaments d'actine, via MACF1 (**Kodama et al., 2003**), ou mDia/formin (**Wen et al., 2004**) fournissant un lien entre le cytosquelette microtubulaire et celui d'actine.

B – Les protéines TOG (*Tumor Overexpressed Gene*)/XMAP215

Le membre fondateur de cette famille est XMAP215 (*Xenopus Microtubule-Associated Protein of 215 kDa*), une protéine identifiée chez le Xénope est décrite comme étant une polymérase qui augmente la croissance des extrémités (+) des MTs. Elle peut également augmenter l'assemblage des MTs *in vitro* (Gard and Kirschner, 1987). De ce fait, XMAP215 est considérée comme la protéine influençant le plus l'augmentation de la vitesse de polymérisation (Brouhard *et al.*, 2008). Elle est largement exprimée et conservée dans toutes les cellules eucaryotes, avec notamment ch-TOG (*colonic and hepatic Tumor Overexpressed Gene*) chez l'homme (Charrasse *et al.*, 1998 ; Al-Bassam and Chang, 2011).

B1 – Structure des protéines TOG

Les protéines TOG présentent un nombre variable de domaines TOG dans leur partie N-terminale, d'environ 200 acides aminés en fonction des organismes (Ohkura *et al.*, 2001 ; cf. Figure 59). Les domaines TOG sont conservés dans l'évolution et sont impliqués dans la liaison à la tubuline (Slep, 2009). Chaque domaine TOG contient plusieurs répétitions HEAT (*Huntingtin, Elongation factor 3, the PR65/A subunit of protein phosphatase 2A and the lipid kinase Tor*), qui régulent les interactions protéine-protéine (Cassimeris *et al.*, 2001) et facilite les interactions avec les MTs (Slep, 2009). La protéine humaine ch-TOG contient cinq domaines TOG (Al-Bassam and Chang, 2011 ; cf. Figure 59). En plus des domaines TOG, la partie N-terminale est constituée d'une région stabilisatrice du MT (Popov *et al.*, 2001). Au centre de la protéine, il y a des régions basiques, riches en sérines, glycine et lysines (*SK-rich domains*), augmentant l'affinité pour les MTs (Popov *et al.*, 2001 ; cf. Figure 59). La partie C-terminale est constituée d'un domaine hélicoïdal, non-répété et conservé, nécessaire pour le ciblage du centrosome et du MT (Popov *et al.*, 2001 ; cf. Figure 59).

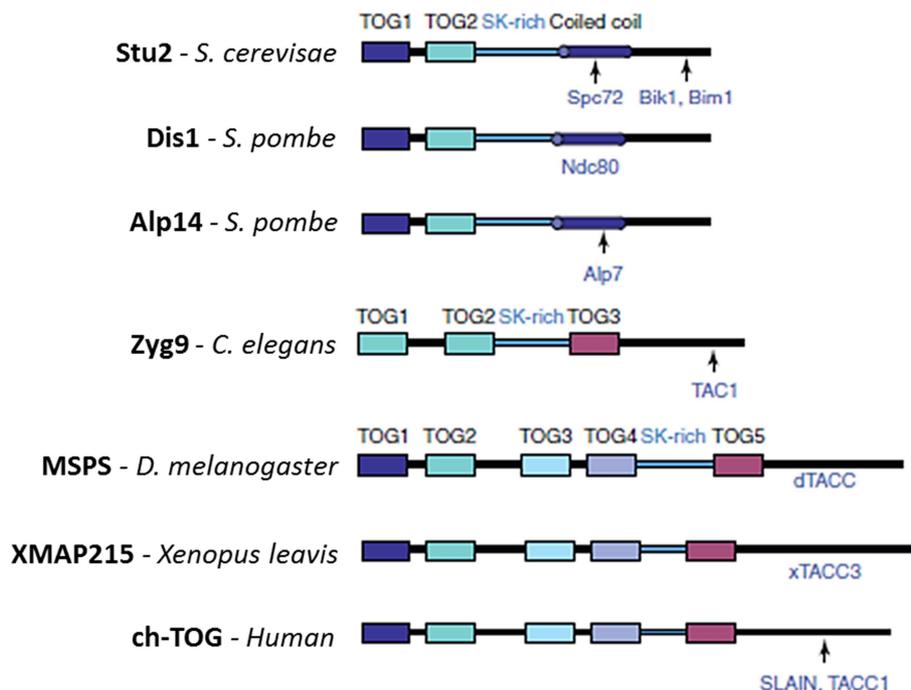


Figure 59 : Conservation des domaines TOG et riches en SK des protéines TOG/XMAP215 dans différents organismes. Les partenaires connus des TOG (*Tumor Overexpressed Gene*) sont indiqués en bleu (d'après Al-Bassam and Chang, 2011).

B2 – Localisation et fonctions des protéines TOG

Les protéines TOG, telles que XMAP215 sont capables de se lier directement aux extrémités (+) des MTs *in vitro* et *in vivo* (Gard and Kirschner, 1987 ; Brouhard *et al.*, 2008). Néanmoins, les protéines TOG ne se localisent pas seulement aux extrémités (+) des MTs, mais aussi le long de la *lattice* et sur la tubuline soluble. Cela leurs permet d'avoir une capacité intrinsèque à favoriser l'élongation des deux extrémités des MTs, mais elles sont plus efficaces au niveau des extrémités (+) (Gard and Kirschner, 1987 ; Vasquez *et al.*, 1994 ; Al-Bassam and Chang, 2011 ; cf. Figure 60). La capacité de XMAP215 à s'associer directement aux extrémité (+) des MTs et à stimuler leurs croissances, a été mise en évidence par des études *in vitro*, utilisant la protéine purifiée (Kinoshita *et al.*, 2001 ; Brouhard *et al.*, 2008). XMAP215 est capable de se lier transitoirement au niveau de l'extrémité (+) du MT et d'ajouter 25 dimères de tubuline, avant de se dissocier (Brouhard *et al.*, 2008). Il est important de noter que les protéines TOG peuvent seulement se lier à des dimères de tubuline et non à des oligomères (Al-Bassam *et al.*, 2006 ; Brouhard *et al.*, 2008).

Des études *in vivo* ont également permis de mettre en avant le rôle des protéines TOG dans la croissance microtubulaire et la stabilisation des MTs (Charrasse *et al.*, 1998 ; Tournebize *et al.*, 2000 ; Brittle and Ohkura, 2005 ; cf. Figure 60). Ces études, ont montré qu'elles augmentent la polymérisation des MTs, comme par exemple, la protéine ch-TOG humaine, qui promeut l'assemblage des MTs (Charrasse *et al.*, 1998). Chez le Xénope, la délétion des protéines TOG est associée à la diminution de la vitesse de polymérisation, l'augmentation des catastrophes et pauses et l'apparition de courts MTs pendant l'interphase (Tournebize *et al.*, 2000 ; Brittle and Ohkura, 2005). L'effet « stabilisateur » de ces protéines serait dû à leur interaction avec des protéines déstabilisatrices de l'environnement microtubulaire. En effet, XMAP215 semble stabiliser les MTs en contrecarrant l'action de déstabilisateurs, comme la dépolymérase XKCM1 (l'homologue de MCAK chez le Xénope, cf. page 125) (Tournebize *et al.*, 2000 ; Kinoshita *et al.*, 2001 ; Ferreira *et al.*, 2014). Cependant, XMAP215 peut aussi augmenter les vitesses de dépolymérisation *in vitro* (Vasquez *et al.*, 1994), ainsi que dans des extraits cellulaires (Tournebize *et al.*, 2000).

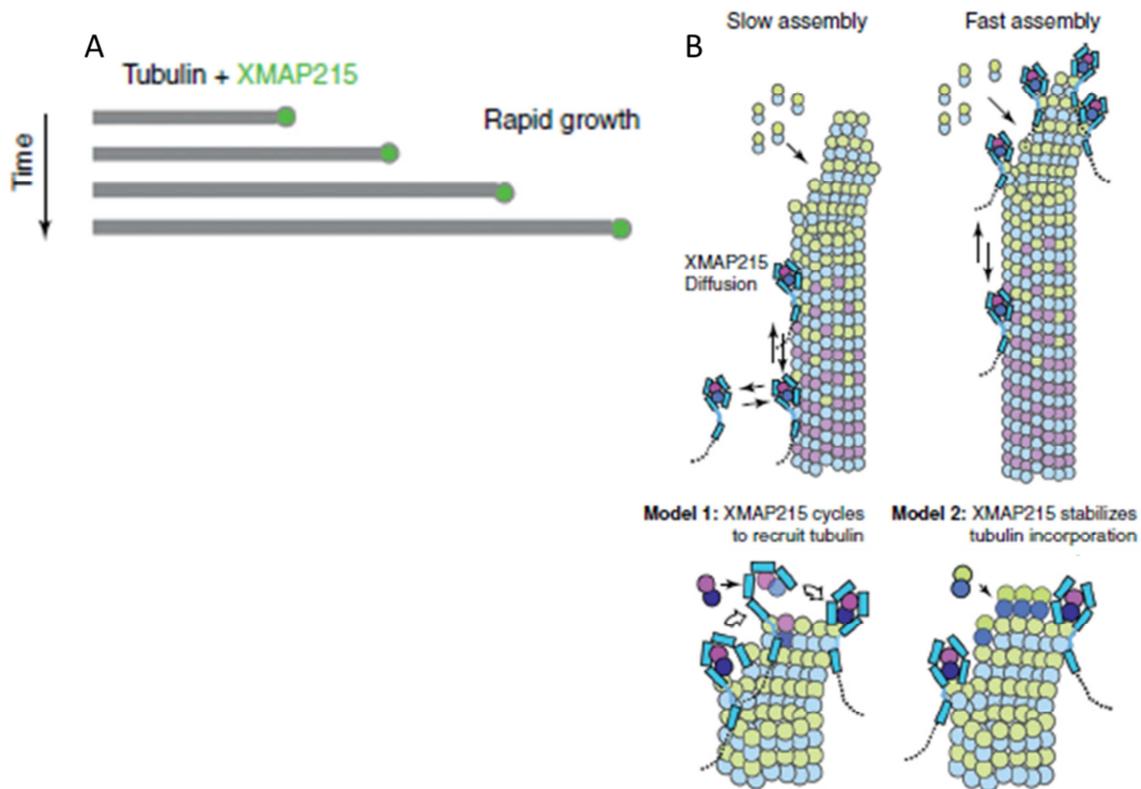


Figure 60 : Localisation et activité des protéines XMAP215 dans la dynamique des microtubules. (A) La protéine XMAP215 (en vert) se localise *in vivo* à l'extrémité (+) des MTs et accélère l'assemblage des MTs, conduisant à la formation de longs microtubules. (B) Modèles montrant l'implication des polymérase XMAP215 dans la dynamique des MTs. En haut de la figure, XMAP215 se lie à des dimères de tubuline (ronds bleu et violet) avec ses domaines TOG (rectangles bleu) et à la *lattice* du MT grâce à ses régions basiques, SK, puis diffuse aux bouts (+) des MTs. En bas de la figure, représentation de deux modèles montrant comment le complexe XMAP215/tubuline augmente l'assemblage des MTs, soit en recrutant les dimères de tubuline aux extrémités (+) des MTs, soit en stabilisant les polymères (d'après **Al-Bassam and Chang, 2011**).

La protéine Stu2, homologue chez la levure de XMAP215, s'enroule autour d'un hétérodimère de tubuline et facilite son incorporation à l'extrémité (+) en croissance du MT (**Al-Bassam et al., 2006 ; Brouhard et al., 2008**). De ce fait, Stu2 a été montrée pour participer à l'augmentation de la vitesse de polymérisation ainsi qu'à la fréquence de catastrophe (**Usui et al., 2003**). De plus, la protéine MOR1 (*Microtubule Organization 1*) d'*Arabidopsis thaliana* (homologue de XMAP215) augmente la croissance et décroissance rapide des MTs (**Kawamura and Wasteney, 2008**).

Il est important de noter que l'activité de XMAP215 et de ses homologues peut être régulée *in vivo* par différents facteurs, comme des +TIPs recrutés par SLAIN/Sentin via EB1 ou les protéines TACC (*Transforming Acidic Coiled-Coil*) (**Peset and Vernos, 2008 ; Li et al., 2012**). Ainsi, il a été montré chez la levure et le Xénope, que XMAP215 peut se lier aux protéines EBs (**Wolyniak et al., 2006 ; Niethammer et al., 2007 ; Zanic et al., 2013**), qui sont essentielles pour l'accumulation des +TIPs aux extrémités (+) des MTs (**Bieling et al., 2007 ; Dixit et al., 2009 ; cf. page 90**). Cette interaction est régulée pendant la mitose, durant laquelle, les microtubules sont courts et dynamiques du fait de la forte activité déstabilisatrice de XKCM1/MCAK (cf. **page 125**). De ce fait, l'interaction de XMAP215 avec EB1 est nécessaire pour contrecarrer la dépolymérase et promouvoir la croissance des MTs (**Niethammer et al., 2007 ; Zanic et al., 2013**).

C – Les protéines CLASPs

Les protéines CLASPs (*Cytoplasmic Linker Protein (CLIP)-Associated Proteins*) ont été isolés par leur affinité pour les CLIPs (**Alhmanova et al., 2001**). Ce sont des +TIPs hautement conservées, qui peuvent supprimer les catastrophes et promouvoir les sauvetages des MTs. Elles sont donc impliquées dans l'organisation des MTs, affectant notamment la mobilité et la division cellulaire (**Mimori-Kiyosue et al., 2005 ; Ferreira et al., 2014**). Comme les protéines XMAP215/chTOG, elles contiennent des domaines TOG assurant leur liaison aux MTs (cf. **Figure 61-A**). Ainsi, elles font également partie de la famille TOG.

Mast (*Multiple asters*) ou Orbit, l'homologue chez la drosophile de CLASP a été identifié via une recherche génétique de mutants mitotiques. Cette protéine de 165 kDa se liant aux microtubules et ayant des motifs de liaison au GTP, est conservée de la levure à l'homme (**Lemos et al., 2000 ; Inoue et al., 2000**). Chez les mammifères, il y a deux gènes paralogues qui codent pour les protéines CLASP1 et CLASP2 (**Akhmanova et al., 2001**). CLASP1 est ubiquitaire, alors que CLASP2 est majoritairement exprimée dans le cerveau et les organes reproducteurs (**Akhmanova et al., 2001**), ainsi que dans les organes hématopoïétiques chez la souris (**Drabek et al., 2012**). Les deux gènes *clasp1* et *clasp2* peuvent subir des événements d'épissage alternatif générant des isoformes. Pour CLASP1, une isoforme biologiquement active a été trouvée, CLASP1 α (d'environ 170 kDa). Tandis que pour CLASP2, trois isoformes sont décrites, CLASP2 α (d'environ 170 kDa), CLASP2 β (d'environ 140 kDa) et CLASP2 γ (d'environ 140 kDa) (**Akhmanova et al., 2001**); cf. **Figure 61-B**).

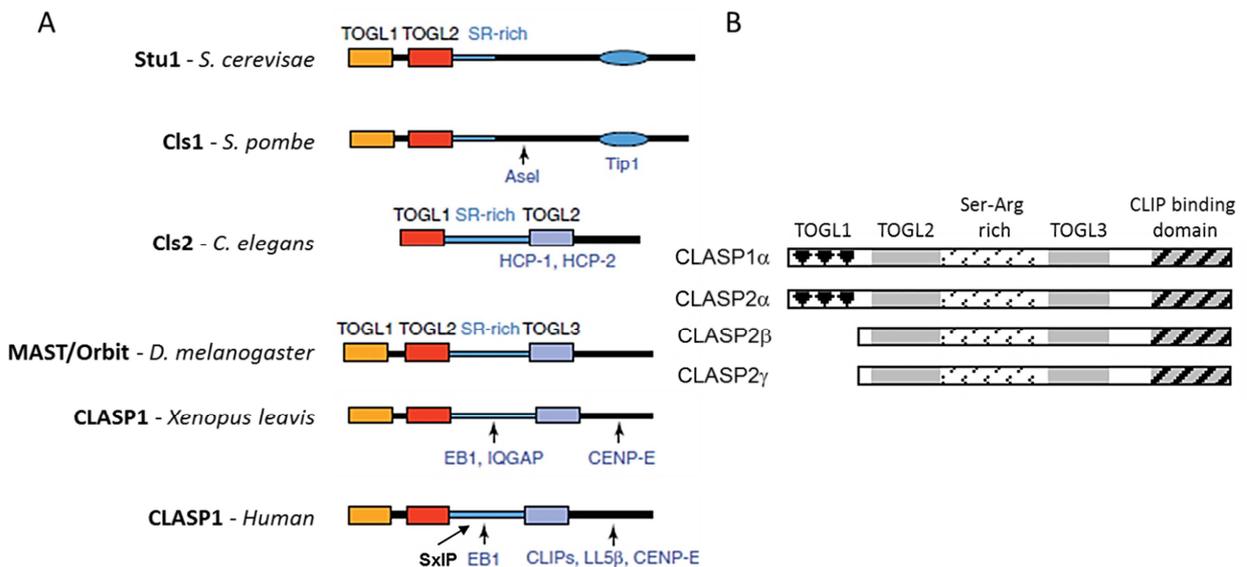


Figure 61 : Conservation de la structure des CLASPs. (A) Domaines structurels des CLASPs dans différentes espèces, avec les sites de fixation de leurs partenaires (en bleu) (TOGL : *Tumor Overexpressed Gene-Like* ; SxIP *Ser-x-Ile-Pro* ; SR-rich : région riche en sérines) (**Al-Bassam and Chang, 2011**). (B) Structure des isoformes humaines des CLASPs, le domaine TOGL1 des isoformes longues (CLASP1 α et CLASP2 α) est indiqué en blanc, alors que les domaines TOGL2 et TOGL3 des isoformes courtes de CLASP2 (β et γ) sont représentés en gris. Le domaine N-terminal (en gris hachuré en noir) assure la dimérisation des CLAPs, ainsi que l'interaction avec ses partenaires, comme les CLIPs (d'après **Mimori-Kiyosue et al., 2005 ; Tsvetkov et al., 2007**).

C1 - Structure des CLASPs

Les membres de la famille des CLASPs ont une structure conservée et ils partagent environ 77% d'homologie dans la séquence nucléotidique (**Akhmanova et al., 2001** ; cf. **Figure 61**).

La partie N-terminale des CLASPs contient un nombre variable de régions TOG-like (TOGL : *Tumor Overexpressed Gene-like*), avec un ayant une faible homologie de séquence avec les protéines de la famille TOG (**Lemos et al., 2000** ; cf. **Figure 61**). Chez la levure, les domaines TOGL de CLASP sont capables d'interagir directement avec les dimères de tubuline solubles, mais pas avec les dimères qui sont déjà incorporés dans la *lattice* du MT (**Al-Bassam et al., 2010** ; **Al-Bassam and Chang, 2011**). Des données structurales ont permis d'identifier les domaines TOGL1 et TOGL2 de CLASP1 humaine (**Leano et al., 2013**). Le domaine TOGL2 de CLASP1 a une conformation courbée, qui pourrait permettre la liaison avec les dimères de tubuline, adoptant une conformation courbée dans les MTs dépolymérisants (**Leano et al., 2013**). Ceci conduit *in fine* à la stabilisation des MTs, ou à un événement de sauvetage (**Al-Bassam and Chang, 2011** ; **Leano et al., 2013**). Pour les isoformes de CLASP2, le domaine TOGL1 est retrouvé uniquement dans l'isoforme longue (CLASP2 α), et est absente des isoformes courtes (CLASP2 β et γ) (**Akhmanova et al., 2001**). Pour ces isoformes courtes, le domaine TOGL1 est remplacé par un court motif de palmitoylation et un petit peptide (MAMGDD), respectivement (**Akhmanova et al., 2001** ; **Ferreira et al., 2014**).

Au centre des CLASPs, deux courts motifs SxIP (Ser-x-Ile-Pro) sont intégrés dans une grande région centrale, intrinsèquement désordonnée et qui est positivement chargée, du fait de la présence de résidus sérines et arginines (**Mimori-Kiyosue et al., 2005** ; **Honnappa et al., 2009** ; **Kumar et al., 2012** ; cf. **Figure 61**). Cette région positivement chargée permet aux domaines TOG-like de se lier avec une plus grande affinité à la *lattice* des MTs. Il a été montré que les motifs SxIP sont nécessaires pour l'interaction avec le domaine C-terminal des protéines EBs, et ils sont importants pour que les CLASPs suivent les extrémités (+) via EB1 (**Mimori-Kiyosue et al., 2005** ; **Kumar et al., 2012**). Lorsque CLASP2 est phosphorylée, elle ne peut plus lier EB1 à cause de la formation de ponts salins intramoléculaires entre les arginines et les phospho-sérines (**Kumar et al., 2012**).

La région centrale des CLASPs contient aussi six répétitions HEAT dans un troisième domaine TOG. Ces répétitions semblent impliquées dans le transport intracellulaire, la dynamique des MTs et la ségrégation des chromosomes (**Neuwald and Hirano, 2000** ; **Tournebize et al., 2000**).

Concernant la partie C-terminale, celle-ci a été montrée pour être impliquée dans l'homodimérisation des CLASPs et la liaison à des partenaires, dont les CLIPs (**Al-Bassam et al., 2010** ; **Patel et al., 2012**).

C2 – Partenaires et fonctions des CLASPs

Un rôle important de CLASP2 a été montré dans la maintenance et le guidage des cellules souches hématopoïétiques *in vivo*. Cela a été mis en lumière en utilisant un modèle de souris déplétées du gène *Clasp2*. Ces souris ont des problèmes d'hématopoïèse car les cellules se détachent de leur niche et leurs MTs sont moins acétylés (**Drabek et al., 2012**). Les auteurs ont pu ainsi observer que CLASP2 est importante pour l'attachement cellulaire et

l'organisation du réseau microtubulaire (Drabek *et al.*, 2012). De plus, plusieurs études mettent en avant que les CLASPs sont impliquées dans le début de l'embryogénèse (Lemos *et al.*, 2000 ; Inoue *et al.*, 2000 ; Park *et al.*, 2012).

De manière générale, dans les cellules en interphase, les CLASPs ont été montrées pour s'associer avec les extrémités (+) des MTs en croissance, les centrosomes et l'appareil de Golgi (Akhmanova *et al.*, 2001 ; Efimov *et al.*, 2007). Plus précisément, afin de s'associer à ces différentes structures cellulaires, les CLASPs interagissent avec d'autres protéines. Dernièrement, des analyses en spectrométrie de masse ont permis d'identifier l'interactome de CLASP2 (Kruse *et al.*, 2017). De plus, dans les cellules en interphase, les CLASPs (CLASP1 α et CLASP2 α) fournissent un lien direct entre les MTs et le cytosquelette d'actine, en interagissant avec les filaments d'actine. Cette interaction entre deux éléments du cytosquelette est important pour la morphogénèse des fibroblastes (Tsvetkov *et al.*, 2007).

La partie C-terminale des CLASPs participe à l'interaction avec l'appareil de Golgi en se liant à la protéine trans-Golgienne, GCC185. Cette interaction contribue à une asymétrie du réseau microtubulaire nucléé au niveau de l'appareil de Golgi dans les cellules polarisées (Efimov *et al.*, 2007). Via leur partie C-terminale, les CLASPs peuvent aussi interagir avec des partenaires protéiques, tels que CLIP-115 et CLIP-170 (Akhmanova *et al.*, 2001 ; cf. page 138), CENP-E (Hannak and Heald, 2006 ; Maffini *et al.*, 2009), Plk1 (Maia *et al.*, 2012) et la chromokinésine Kid, qui est impliquée dans l'alignement des chromosomes (Levesque and Compton, 2001 ; Wandke *et al.*, 2012 ; Patel *et al.*, 2012). Lorsque CLIP-170 interagit avec la partie C-terminale des CLASPs cela a pour effet d'augmenter l'association des CLASPs au niveau de l'extrémité (+) des MTs (Mimori-Kiyosue *et al.*, 2005 ; cf. Figure 62). Néanmoins, cette interaction n'est pas indispensable pour la localisation des CLASPs aux extrémités (+) des MTs (Wittmann and Waterman-Storer, 2005). L'accumulation des CLASPs aux extrémités (+) des MTs et leur capacité à stabiliser les MTs sont importantes pour permettre l'interaction des MTs avec le cortex cellulaire, notamment via un complexe composé de LL5 β et de la spectraplakine (MACF1) (Lansbergen *et al.*, 2006 ; Drabek *et al.*, 2006 ; cf. Figure 62).

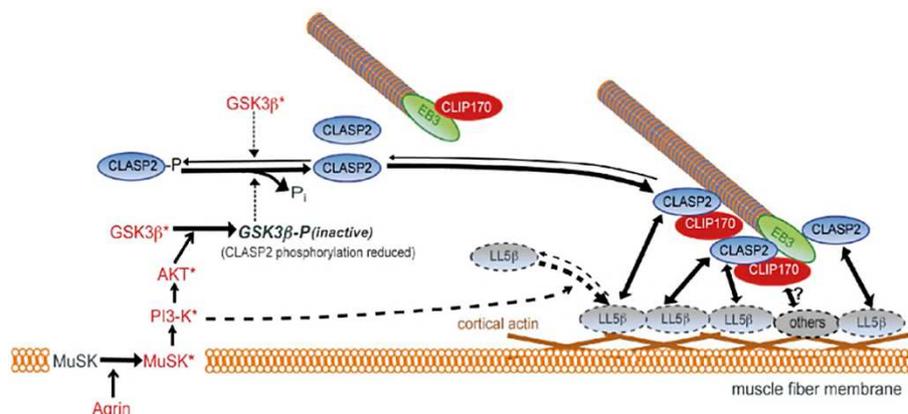


Figure 62 : Fonction de CLASP2 dans la capture des microtubules à la périphérie cellulaire. Dans les jonctions neuromusculaires CLIP-170/CLASP2 stabilisent les microtubules au niveau de la membrane post-synaptique. La capture des microtubules au cortex cellulaires est régulée par : l'inactivation locale de GSK3 β , qui favorise le recrutement de CLASP2 non-phosphorylée dans l'extrémité (+) et la *lattice* des microtubules, le recrutement de CLIP-170 via son interaction avec CLASP et les microtubules, ainsi que le recrutement et l'immobilisation de LL5 β (Schmidt *et al.*, 2012).

Concernant la dynamique des MTs à proprement parlé, chez la levure il a été montré que les CLASPs peuvent se lier à la *lattice* du MT et recruter des dimères de tubuline soluble pour empêcher leur dépolymérisation et ainsi en favorisant leur sauvetage (**Al-Bassam et al., 2010** ; cf. **Figure 63**). Dans les cellules HeLa, au niveau de la périphérie cellulaire, les CLASPs participent au sauvetage des microtubules en favorisant leur re-polymérisation (**Mimori-Kiyosue et al., 2005**). Elles sont également nécessaires à la stabilisation des MTs au niveau de la périphérie cellulaire dans les fibroblastes (**Akhmanova et al., 2001**). Par exemple, chez la levure fissipare (*S. pombe*) Clsp1 (homologue de CLASP) assure la stabilisation des MTs, aussi bien en interphase qu'en mitose (**Bratman and Chang, 2007**). CLASP2 est nécessaire pour l'établissement d'un réseau microtubulaire stable et polarisé dans des fibroblastes de souris (**Drabek et al., 2006**). De plus, la déplétion en CLASPs par siRNA résulte en une diminution de la tubuline acétylée et de la densité microtubulaire (**Mimori-Kiyosue et al., 2005**). Les CLASPs vont pouvoir augmenter la stabilité des MTs, sans affecter le taux de polymérisation global, en agissant sur la longévité des MTs. Chez la drosophile, cela est possible en favorisant les phases de pause (**Sousa et al., 2007**). Chez la levure, l'inactivation de Clsp1 engendre une dépolymérisation plus rapide, indiquant que Clsp1 empêche le désassemblage complet des MTs et permet la polymérisation de leurs extrémités (+) (**Bratman and Chang, 2007**). Chez le xénope, une autre étude a permis de montrer que lors de la mitose, CLASP1 peut interagir avec PRC1, une protéine entourant le MT au centre du fuseau mitotique via son motif SxIP et son domaine TOG, afin de contribuer à la dynamique des MTs (**Patel et al., 2012**). De cette façon, les CLASPs augmentent la stabilité et la densité microtubulaire dans différentes structures cellulaires chez les animaux, les plantes et les champignons (**Galjart, 2005**).

Cette fonction stabilisatrice des CLASPs conduit à l'hypothèse que la liaison des CLASPs aux extrémités (+) des MTs est nécessaire pour permettre les événements de sauvetage et donc réduire le nombre d'épisodes de longue dépolymérisation (**Akhmanova et al., 2001** ; **Mimori-Kiyosue et al., 2005** ; **Sousa et al., 2007** ; **Al-Bassam et al., 2010** ; cf. **Figure 63**). Il a été montré qu'en absence de CLASP (par siRNA), EB1 est mal localisé. Ainsi, les auteurs ont conclu que dans les cellules, les CLASPs régulent le recrutement au niveau des extrémités (+) des MTs des protéines EBs (**Grimaldi et al., 2014**).

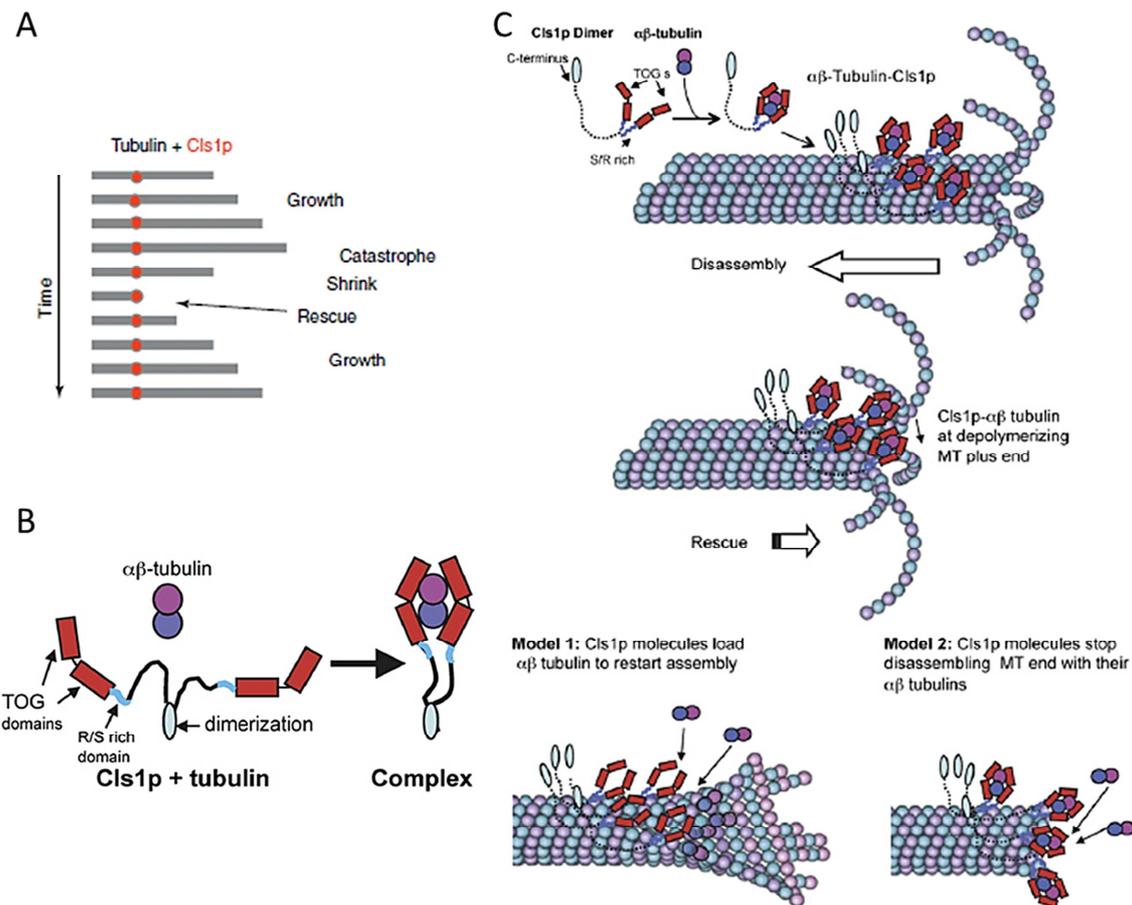


Figure 63 : Localisation et activité des protéines CLASPs dans la dynamique des microtubules. (A) L'homologue CLASP de *S. pombe* (Cls1p, en rouge) se lie à la *lattice* des MTs et favorise localement le sauvetage et empêchant les MTs de dépolymériser complètement (d'après **Al-Bassam and Chang, 2011**). (B) Modèle du changement conformationnel de Cls1p permettant la liaison des hétérodimères de tubuline par les domaines TOG (d'après **Al-Bassam and Chang, 2010**). (C) En haut de la figure, les CLASPs se lient aux dimères de tubuline avec ces domaines TOG-like et son affinité pour la *lattice* du MT est augmentée avec ses domaines riches en sérines et arginines. Les CLASPs inhibent les événements de catastrophe et favorisent les événements de sauvetage. En bas de la figure, deux modèles expliquent comment CLASP promeut le sauvetage microtubulaire, soit en agissant comme une polymérase localement au niveau des extrémités (+), soit en agissant comme un facteur anti-catastrophe (d'après **Al-Bassam and Chang, 2010**).

Pendant la mitose, CLASP2 phosphorylée est retrouvée au niveau des kinétochores. En effet, la phosphorylation de CLASP2 par GSK3 β /Cdk1 empêche sa localisation aux bouts (+) des MTs car elle interagit moins avec EB1 (**Kumar et al., 2012**). Au début de la mitose, le complexe CLASP1/KIF2b est recruté aux kinétochores pour favoriser le mouvement des chromosomes, le *turnover* des MTs associés aux kinétochores et corriger les erreurs d'attachement. Cependant, pendant la métaphase, le complexe CLASP1/Astrin remplace ce complexe pour augmenter la stabilité des MTs attachés aux kinétochores et l'alignement des chromosomes (**Manning et al., 2010**). Une autre étude a montré que dans les cellules humaines, CLASP1 et CLASP2 sont recrutées au niveau des kinétochores par CENP-E (cf. **page 128**) indépendamment de son activité motrice et de la présence des MTs. Des expériences par siRNA ont montré que cette interaction est importante pour le mouvement correct des chromosomes et l'architecture du fuseau mitotique, en régulant la dynamique des MTs (**Maffini et al., 2009**).

Les CLASPs participent également à la migration cellulaire. Par exemple, dans les cellules endothéliales en migration, CLASP1 agit sur la dynamique des MTs, en augmentant le nombre de protrusions qui guident la migration des cellules endothéliales (**Myer and Myers, 2017**).

D – Les protéines APC

La protéine APC (*Adenomatous Polyposis Coli*) est une grosse protéine d'environ 300 kDa, codée par le gène *Apc*, qui est un gène suppresseur de tumeur colorectale (**Smith et al., 1993 ; Zhang and Shay, 2017**). APC fait partie du complexe de la β -caténine pour inhiber la voie Wnt. Chez les mammifères, il y a une forme additionnelle, qui est produite par le gène *APC2/APCL* (*APC-like protein*) spécifiquement dans le cerveau (**Nakagawa et al., 1998**). Chez la levure bourgeonnante (*S. cerevisiae*), l'homologue d'APC est Kar-9 (*Karyogamy protein 9*). Dans cette dernière, la voie de signalisation contenant Kar-9 favorise l'alignement des chromosomes et la formation du fuseau mitotique, lors de la métaphase (**Manatschal et al., 2016**). Chez les mammifères, APC stabilise les MTs et contrôle la dynamique du fuseau mitotique et la fonction des kinétochores pendant la mitose, ainsi que la neurogénèse, la prolifération et la migration des cellules (**Zhang and Shay, 2017**).

D1 – Structure de la protéine APC

Dans sa partie N-terminale, la protéine APC possède un domaine *coiled-coil* et un domaine Arm (*Armadillo repeat*). Le domaine *coiled-coil* permet l'oligomérisation de la protéine, tandis que le domaine Arm en se liant à IQGAP1 est impliqué dans la migration et l'adhésion des cellules (**Akhmanova and Steinmetz, 2010**). Au centre de la protéine, il y a des motifs de liaison à la β -caténine (répétés de 15 à 20 acides aminés) et des motifs de liaison à l'axine (SAMP) impliqués de la dégradation de la β -caténine (**Zhang and Shay, 2017**). De plus, il y a aussi une série de lysines (KKKK), qui pourrait jouer le rôle de signal de localisation nucléaire (**Ferreira et al., 2014**). Dans sa partie C-terminale, APC possède un domaine basique de liaison aux MTs et un domaine de liaison à EB1 (**Su et al., 1995 ; Zhang and Shay, 2017 ; cf. Figure 64-A**). Plus précisément, l'interaction d'APC avec EB1 dépend de son motif SxIP (Ile2805 et Pro2806). L'apparition de mutations dans ce motif sont suffisantes pour abolir l'interaction d'APC avec EB1, ainsi que sa capacité à se localiser à l'extrémité (+) des MTs (**Honnappa et al., 2005 ; Honnappa et al., 2009**). La perte de la région C-terminale de la protéine est associée au phénomène tumorigénique (**Zhang and Shay, 2017 ; cf. Figure 64-B**).

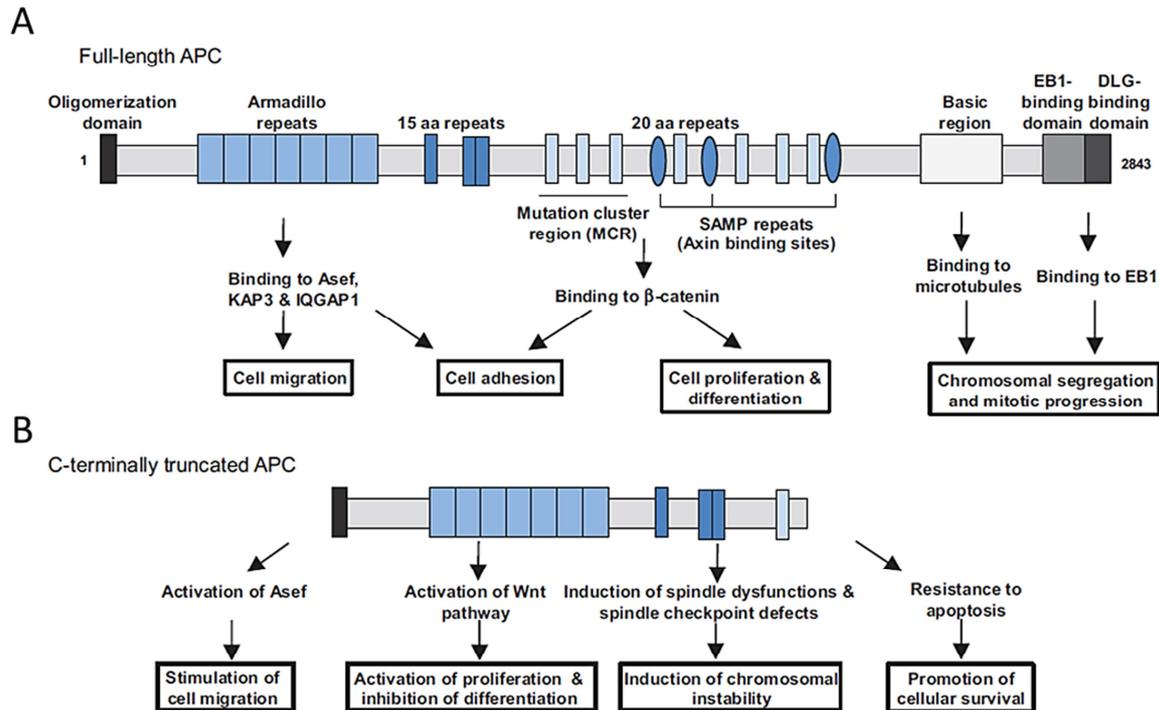


Figure 64 : Structure d'APC montrant l'organisation de ses domaines fonctionnels. (A) La protéine APC de taille entière contient plusieurs domaines, dont de gauche à droite, un domaine d'oligomérisation, des répétitions Arm, un domaine de liaison à la β -caténine, un domaine de liaison à l'axine (SAMP), une région basique (basic-S/P) de liaison aux microtubules et un motif de liaison à EB1(SxIP). Comme APC interagit avec différents partenaires (en noir), elle est impliquée dans plusieurs processus cellulaires reliés à la migration, l'adhérence, la prolifération et différenciation des cellules, ainsi que la ségrégation des chromosomes et la progression du cycle cellulaire. La plupart des mutations d'APC arrive dans la région MCR. (B) La protéine tronquée de sa partie C-terminale perd son domaine de liaison aux MTs, à EB1 et à la β -caténine, conduisant à une stimulation plus forte de la migration et la survie des cellules à l'origine de la cancérogénèse (Arm : *Armadillo repeat* ; MCR : *Mutation Cluster Region* ; SAMP : *Ser-Ala-Met-Pro repeat* ; Basic-S/P : régions enrichies en acides aminés basiques, serine et proline ; SxIP : *Ser-x-Ile-Pro*) (Zhang and Shay, 2017).

D2 – Fonctions d'APC dans l'environnement microtubulaire

In vitro et *in vivo*, APC se lie directement aux MTs et favorise leur polymérisation et stabilisation (Munemitsu *et al.*, 1994 ; Nakamura *et al.*, 2001 ; Zumbunn *et al.*, 2001). L'interaction d'APC avec les MTs passe aussi par des intermédiaires, comme EB1. L'interaction entre APC et EB1 est importante, car elle peut aider à réguler la stabilité des MTs et à promouvoir la migration cellulaire (Wen *et al.*, 2004). Mais cela reste controversé (Drabek *et al.*, 2006). De plus, cette interaction semble importante pour permettre l'accumulation des protéines APC aux extrémités (+) des MTs (Mimori-Kiyosue *et al.*, 2002 ; Honnappa *et al.*, 2009 ; Noordstra and Akhmanova, 2017 ; cf. Figure 65). Cependant, ce n'est pas le seul mécanisme qu'APC utilise pour se localiser indirectement au niveau des extrémités (+) des MTs en croissance (Kita *et al.*, 2006). En effet, de façon minoritaire, APC peut être recrutée aux bouts (+) des MTs en interagissant avec la superfamille des kinésines (KIF3A/KIF3B) (Jimbo *et al.*, 2002).

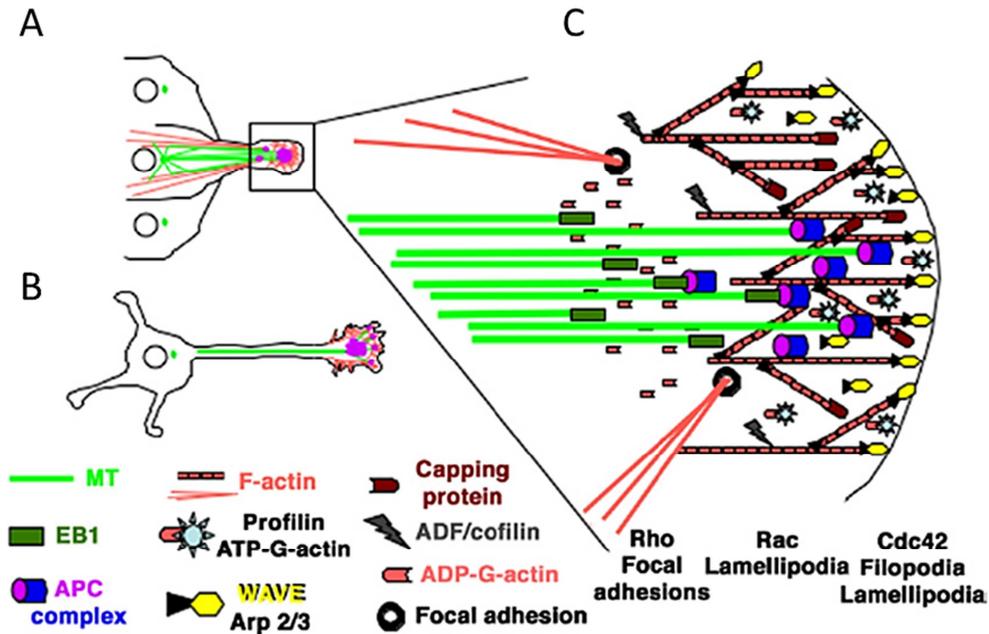


Figure 65 : Organisation du cytosquelette et des protéines de signalisation lors de la migration directionnelle (A) d'une cellule épithéliale, (B) d'une cellule neuronale. (C) Au niveau du front de migration, les microtubules (en vert clair) délivrent des composants membranaires via la voie d'exocytose. L'activation d'APC (en violet) favorise l'extension directionnelle des cellules, probablement en interagissant via EB1 (en vert foncé) avec les extrémités (+) des microtubules et en régulant la dynamique des polymères à la périphérie cellulaire. APC peut aussi interagir directement avec l'actine (en rouge) via son domaine de liaison à l'actine ou indirectement via son interaction avec Cdc42/Rac et IQGAP1 (d'après **Barth et al., 2008**).

L'association d'APC avec les MTs a été montrée comme essentielle pour la migration, ainsi que la polarisation cellulaire. En effet, via l'activation d'APC (cf. **Figure 66**), l'extension et la polarisation unidirectionnel des cellules est favorisée (**Barth et al., 2008** ; cf. **Figure 65**). Par exemple, Cdc42 est impliquée dans la polarité cellulaire, en régulant spatialement l'activité de GSK3 β et d'APC (**Etienne-Manneville and Hall, 2003** ; cf. **Figure 66**). Cette dernière fonction d'APC peut expliquer les bases moléculaires de son activité anti-tumorale. En effet, elle est définie comme une protéine suppresseur de tumeur qui stabilise les MTs. Par conséquent, si APC est mutée, elle peut induire la cancérogénèse en favorisant la migration cellulaire (**Zhang and Shay, 2017**). La protéine APC est également impliquée *in vitro* et *in vivo* dans l'interaction entre les MTs et le cytosquelette d'actine (**Moseley et al., 2007** ; cf. **Figure 65-C**). Les auteurs ont aussi montré qu'*in vitro*, cette interaction est inhibée en présence d'EB1.

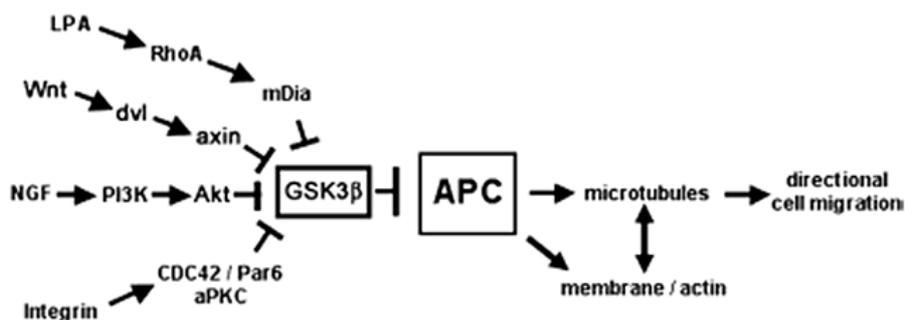


Figure 66 : Voie de signalisation induisant l'activation d'APC dans des cellules en migration (**Bart et al., 2008**).

E - Les protéines à domaine CAP-Gly

Cette famille de +TIPs regroupe les protéines CLIPs, CLIP-170 et CLIP-115 (cf. **page 138**), la grosse sous-unité de la dynactine, p150^{Glued} (cf. **page 106**) ainsi que CYLD (cf. **page 108**). Ces protéines possèdent au moins un domaine CAP-Gly (*Cytoskeleton-Associated Protein Gly-rich*). Ces protéines sont structurellement semblables car elles possèdent au moins un domaine CAP-Gly. Ce dernier est impliqué dans la liaison des protéines aux MTs, soit directement en liant le motif EEY/F en C-terminal de l' α -tubuline, soit indirectement en liant le motif EEY/F en C-terminal d'EB1 (cf. **page 112**).

Les protéines ayant des domaines CAP-Gly ont été initialement identifiées, *in vivo*, comme ayant un comportement d'accumulation aux extrémité (+) des MTs (**Diamantopoulos et al., 1999 ; Perez et al., 1999**), cela inclus notamment les CLIPs (cf. **page 138**) et p150^{Glued} (cf. **page 106**) (**Akhmanova and Steinmetz, 2008**). Ces protéines sont impliquées dans l'organisation des microtubules et le transport des vésicules et organites le long du réseau microtubulaire. De plus, elles interagissent avec divers partenaires, assurant ainsi la formation d'interactions protéiques dans l'environnement microtubulaire (**Galjart, 2005 ; Akhmanova and Steinmetz, 2008**; cf. **page 112**). En effet, les domaines CAP-Gly s'associent avec les motifs EEY/F dans la partie C-terminale des protéines EBs (**Bjelić et al., 2012**), et de l' α -tubuline (**Weisbrich et al., 2007 ; Mishima et al., 2007 ; Bieling et al., 2008**), mais aussi avec le domaine doigt de zinc en C-terminal de CLIP-170 (**Lansbergen et al., 2004**) et SLAIN2 (une protéine se liant aux domaines GAP-Gly de CLIP-170 en N-terminal) (**van der Vaart et al., 2011 ; cf. page 110 et Annexe I**). Il est important de noter que les protéines ayant un ou des domaine(s) CAP-Gly seront incapables de se lier aux dimères de tubuline pour lesquels il manque la tyrosine du motif EEY/F en C-terminal de l' α -tubuline (**Peris et al., 2006**).

E1 – Les protéines CLIPs

Les protéines CLIPs (*Cytoplasmic Linker Proteins*) traitées dans le §V (cf. **page 138**) contiennent deux domaines CAP-Gly en N-terminal (cf. **page 92**). Ces protéines sont impliquées dans la dynamique des MTs en favorisant les sauvetages et donc, en permettant la croissance microtubulaire (**Komarova et al., 2002a ; Galjart, 2005 ; Mimori-Kiyosue et al., 2005**). Les CLIPs régulent aussi la localisation du moteur moléculaire dynéine/dynactine (**King et al., 2003**), et elles coopèrent avec les CLASPs (cf. **page 98**), directement dans le réseau microtubulaire (**Schuyler and Pellman, 2001 ; Howard and Hyman, 2003**), régulant ainsi l'asymétrie cellulaire (**Galjart, 2005**).

E2 – La sous-unité de la dynactine, p150^{Glued}

La grande sous-unité de la dynactine, p150^{Glued}/DCTN1 contient aussi un domaine CAP-Gly et une région basique, enrichie en sérines dans sa partie N-terminale (cf. **Figure 67**). Cette partie N-terminale est nécessaire pour initier le transport rétrograde dépendant de la dynéine car il régule le chargement de la dynactine sur les extrémités (+) des MTs (**Moughamiam et al., 2013**). Par ailleurs, son domaine CAP-Gly lui permet également de se lier directement à EB (cf. **page 90**). Néanmoins, bien qu'*in vitro* p150^{Glued} puisse se lier directement à EB (**Bjelić et al., 2012**), son affinité pour les extrémités (+) des microtubules

est faible. De ce fait, dans les cellules la liaison de p150^{Glued} aux extrémités (+) des MTs est assistée par CLIP-170 (Lansbergen *et al.*, 2004 ; Moughamian *et al.*, 2013). Dans la partie centrale de la protéine, deux domaines *coiled-coil* sont retrouvés, permettant la dimérisation de la protéine et la liaison avec la dynéine (Yan *et al.*, 2013 ; cf. Figure 67). Le second domaine *coiled-coil* interagit avec Arp1, formant un court filament ressemblant à l'actine, à la base du complexe avec la dynactine. (Vaughan *et al.*, 2002 ; Yan *et al.*, 2013 ; cf. Figure 67). La partie C-terminale de la protéine est impliquée dans de multiples interactions (Lazarus *et al.*, 2013), notamment en s'associant à divers adaptateurs vésiculaires, telles que RILP, HAP1 (*Huntingtin-Associated Protein 1*), SNX6 et JIP1 (*JNK-Interacting Protein 1*) (Fu and Holzbaur, 2014 ; cf. page 116).

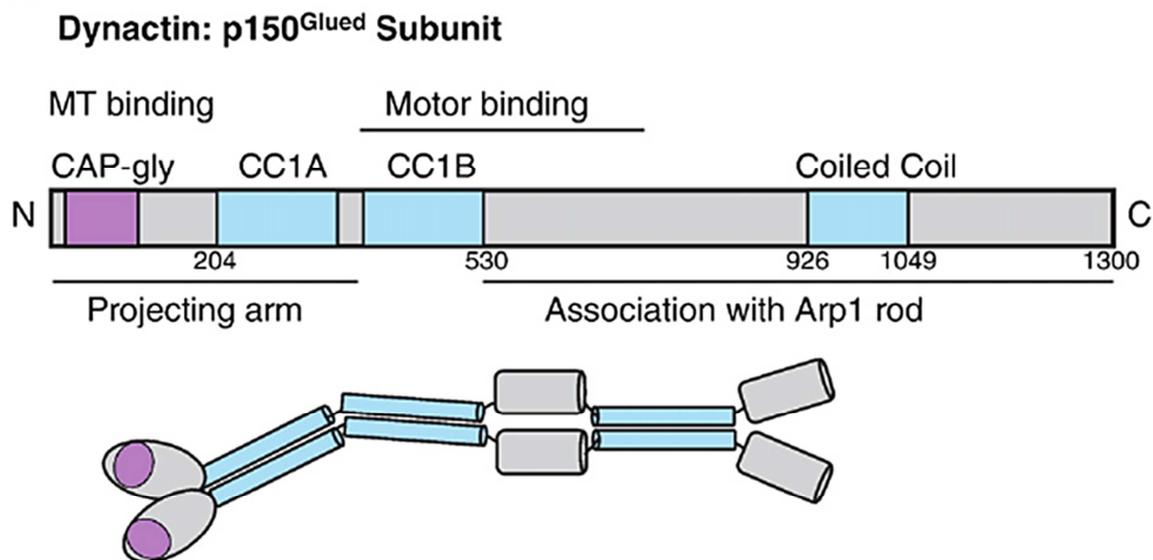


Figure 67 : Structure de la sous-unité de la dynactine de mammifère, p150^{Glued}. Représentation de l'organisation de ses domaines fonctionnels (CAP-Gly : *Cytoskeleton-Associated Protein Glycine-rich* ; CC : *Coiled-Coil*) avec les sites d'interaction avec ses partenaires, ainsi qu'un homodimère (en bas). La protéine dimérise au niveau de ses domaines *coiled-coil* (en bleu) (d'après Yan *et al.*, 2013).

La protéine p150^{Glued} est codée par le gène *DCTN1* et subit des épissages alternatifs *in vivo*, conduisant à différentes isoformes plus ou moins tronquées. Cette protéine est spécifiquement enrichie au niveau des extrémités (+) des MTs, aussi bien *in vivo* (Vaughan *et al.*, 2002) qu'*in vitro* (Chowdhury *et al.*, 2015).

De par sa localisation, p150^{Glued} peut modifier la dynamique des MTs, notamment en favorisant la formation des microtubules, et en empêchant les catastrophes. Cela a conduit à la caractérisation de p150^{Glued} comme un facteur anti-catastrophe dans les neurones (Lazarus *et al.*, 2013). De plus, afin d'altérer la dynamique des MTs, p150^{Glued} peut se lier à la *lattice* des microtubules et à la tubuline soluble (Lazarus *et al.*, 2013 ; Moughamian *et al.*, 2013). La sous-unité de la dynactine, p150^{Glued} a également une implication dans la dynamique microtubulaire, en interagissant aussi bien avec les protéines EBs (Bjelić *et al.*, 2012), que la partie C-terminale de CLIP-170 (Lansbergen *et al.*, 2004).

Comme l'isoforme de taille entière est essentiellement exprimée dans les neurones, il a été proposé que l'activité de pro-polymérisation de p150^{Glued} peut être spécifique des neurones (Lazarus *et al.*, 2013). En accord avec cela, les auteurs ont trouvé que dans les cellules épithéliales, la délétion de p150^{Glued} n'a pas d'effet sur la dynamique des microtubules. En

revanche, dans les neurones, ils ont observé une augmentation significative des événements de catastrophe quand p150^{Glued} est déléetée, tandis que l'expression de l'isoforme neuronale sauve ce phénotype (Lazarus *et al.*, 2013).

E3 – La désubiquitinase CYLD

L'enzyme de désubiquitination, CYLD (*deubiquitylase cylindromatosis*) est codée par le gène suppresseur de tumeur *Cyld*, retrouvé muté dans une tumeur cutanée bénigne, appelée cylindromatose (Yang and Zhou, 2016). Cette enzyme appartient à la famille des CAP-Gly, du fait qu'elle possède trois domaines CAP-Gly en N-terminal ainsi qu'un domaine USP (*Ubiquitin-Specific Protease*) en C-terminal. Ces domaines CAP-Gly sont nécessaires pour ses fonctions physiologiques et pathologiques (Yang and Zhou, 2016 ; cf. Figure 68). CYLD est impliquée dans différentes voies de signalisation (NF- κ B, JNK, p38, TGF- β , Wnt/ β -caténine), en désubiquitinant des protéines de ces voies (Yang and Zhou, 2016 ; cf. Figure 68).

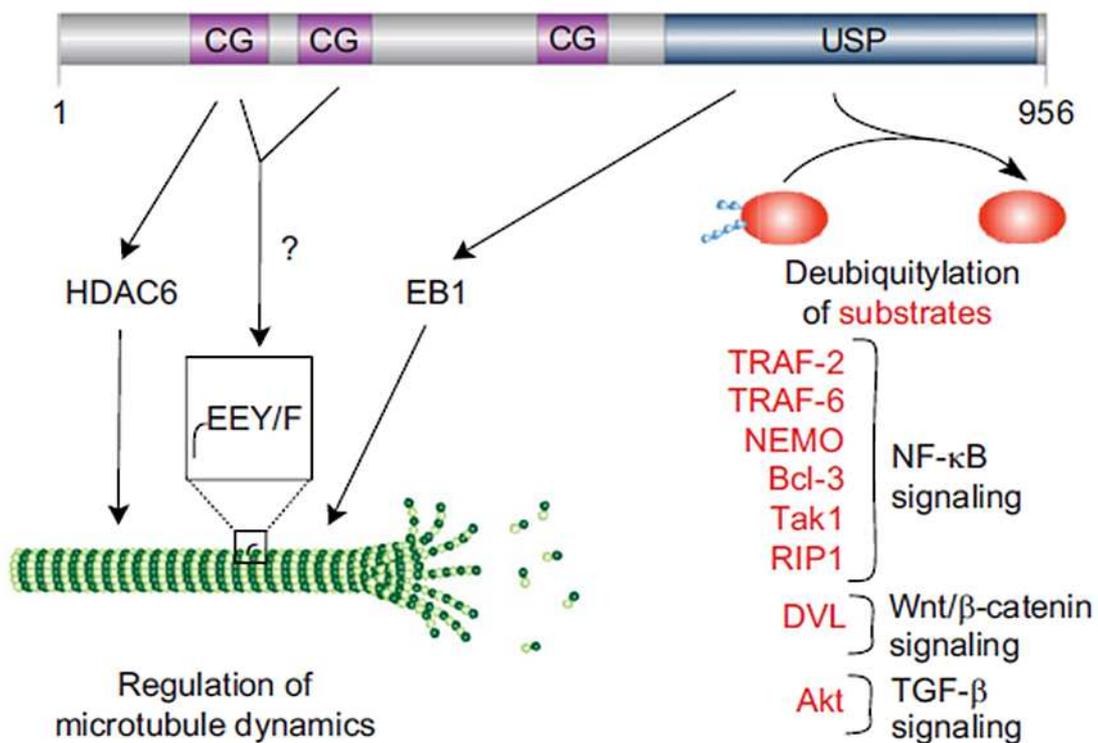


Figure 68 : Structure de CYLD. Organisation de ses domaines structuraux : CG (CAP-Gly, en violet) et USP (*Ubiquitin-Specific Protease*, en bleu). Les deux premiers domaines CAP-Gly interagissent avec les MTs, sûrement via le motif EEY/F C-terminal de la tubuline (en vert). De plus le premier domaine CAP-Gly se lie à HDAC6, tandis que le domaine USP interagit avec EB1. Ces différentes interactions permettent à CYLD de participer à la régulation de la dynamique des MTs. L'activité enzymatique du domaine USP permet la désubiquitination de divers substrats appartenant à différentes voies de signalisation (Yang and Zhou, 2016).

Différentes études ont montré que CYLD s'associe *in vitro* et dans les cellules avec les MTs (Gao *et al.*, 2008), au niveau des extrémités (+) (Li *et al.*, 2014). Plus précisément, il a été montré que les deux premiers domaines CAP-Gly peuvent se lier directement à la tubuline et aux MTs, sachant que le premier CAP-Gly est le domaine qui a la plus grande affinité pour la tubuline (Gao *et al.*, 2008 ; Wickström *et al.*, 2010). Mais, il reste à vérifier si le motif EEY/F de la queue C-terminale de la tubuline interagit directement avec les deux premiers

domaines CAP-Gly de CYLD. Cependant, d'autres études ont mis en évidence que CYLD est principalement localisée dans le cytoplasme et au niveau du fuseau mitotique, mais plus faiblement avec les MTs. Son affinité pour les MTs est plus faible que les autres MBPs (*Microtubule Binding Proteins*) canoniques, telles qu'EB1 ou CLIP-170 (Yang and Zhou, 2016). Ces différences d'affinité peuvent venir du fait que ses trois domaines CAP-Gly ne possèdent pas les motifs GKNDG habituels (Weisbrich *et al.*, 2007 ; Yan *et al.*, 2013), mais des motifs GFTDG, GNWDG et GCTDG respectivement, qui sont potentiellement moins affins pour le motif EEY/F C-terminal de l' α -tubuline (Yang and Zhou, 2016).

Il a été montré *in vivo* et *in vitro* que CYLD se lie également à EB1 (Li *et al.*, 2014) qui contient aussi un motif EEY/F, étant impliqué dans la liaison d'EB1 avec les domaines CAP-Gly (Weisbrich *et al.*, 2007). De plus, dans les cellules, CYLD peut aussi interagir avec HDAC6 (Wickström *et al.*, 2010), qui est une enzyme associée aux MTs dé-acétylant diverses protéines dont la tubuline dans le cerveau de la souris (Liu *et al.*, 2015). Ainsi, CYLD peut réguler la dynamique et des fonctions des MTs, comme la migration cellulaire, la cillogenèse et la progression du cycle cellulaire, en interagissant directement ou indirectement, via EB1 et HDAC6, avec les MTs (Gao *et al.*, 2008 ; Wickström *et al.*, 2010 ; Li *et al.*, 2014 ; Yang and Zhou, 2016 ; cf. Figure 68). Son rôle dans l'assemblage des MTs a été montré dans des cellules déplétées en CYLD, en suivant la repolymérisation des MTs après un traitement nocodazole transitoire. CYLD accélère la repolymérisation et augmente la polymérisation des MTs, en diminuant la concentration critique en tubuline nécessaire pour l'assemblage (Gao *et al.*, 2008).

F – Les protéines motrices

Les moteurs moléculaires dynéines et kinésines sont des MAPs motrices abordées dans le III de cette thèse (cf. page 115). Elles sont pour certaines capables de se localiser au niveau des extrémités (+) des MTs, où elles sont impliquées dans différents processus cellulaires fondamentaux, comme la génération d'une force à l'interface entre les extrémités des MTs et le cortex cellulaire, le désassemblage des MTs, le transport de constituants cellulaires et la transmission de signaux au cortex cellulaire qui gouvernent l'assemblage de l'actine et la polarité cellulaire (Wu *et al.*, 2006 ; Kobayashi and Murayama, 2009).

Le transport rétrograde des dynéines est principalement régulé au niveau des extrémités (+) des MTs, où le chargement des cargaisons est réalisé. Il a été montré que le mécanisme de rétention actif de ces moteurs moléculaires au niveau des bouts (+) des MTs, nécessite l'interaction de la dynactine avec EB1 (cf. page 118) (Schuster *et al.*, 2011). De plus, la protéine +TIP, LIS1 (cf. page 119) peut interagir avec la dynéine.

La plupart des kinésines du fait de leur mobilité vont atteindre les bouts (+) des MTs, où elles pourront s'accumuler. C'est le cas MCAK de la famille des kinésines-13 qui favorise le désassemblage des MTs (van der Vaart *et al.*, 2009), ainsi que CENP-E de la famille de la kinésine-7, qui favorise l'élongation des MTs, en stabilisant le bout (+) dans une conformation droite, favorable à l'ajout des sous-unités de tubuline (Sardar *et al.*, 2010). D'autres kinésines se concentrent au niveau des extrémités (+) des MTs, grâce à leur interaction avec la +TIP EB1 (Bieling *et al.*, 2007). C'est le cas pour Tea2 (homologue de la famille de la kinésine-7 chez *S. pombe*), qui a besoin d'interagir avec Mal3 (homologue chez

la levure d'EB1) pour suivre les extrémités (+) des MTs et stimuler son activité ATPase (Busch and Brunner, 2004 ; Browning and Hackney, 2005 ; Bieling *et al.*, 2007). Le même comportement a été décrit pour la kinésine-5 mitotique, Eg5. Elle interagit avec EB1 via un motif canonique SxIP (Jiang *et al.*, 2012). C'est aussi le cas pour la kinésine-8, KIF18B, mais cette fois-ci, l'interaction avec EB1 ne se fait pas par un motif canonique SxIP, mais via des séquences similaires (Stout *et al.*, 2001).

G – Les autres protéines +TIPs

La famille des +TIPs regroupe d'autres protéines que nous n'aborderons pas de façon exhaustive ici, sachant que le nombre de protéines +TIPs est toujours croissant (Tamura and Draviam, 2012 ; Grimaldi *et al.*, 2015).

Dans la famille des protéines SxIP, en plus d'APC, deux autres protéines y sont rassemblées, ce sont SLAIN1/2, MACF1 et STIM1 (*Stromal Interaction Molecule 1*) (Akhmanova and Steinmetz, 2010 ; van der Vaart *et al.*, 2011 ; cf. Figure 69).

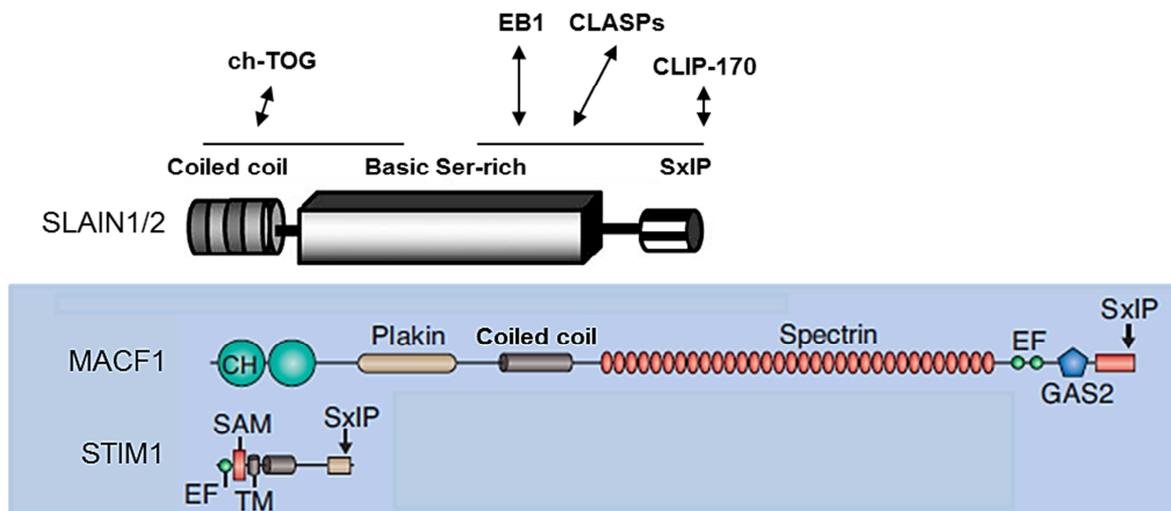


Figure 69 : Structure de SLAIN1/2, MACF1 et STIM1. Représentation de l'organisation des domaines structurels (CH : *Calponin Homology* ; EF : motif de liaison du Ca^{2+} ; GAS2 : *Growth-Arrest-Specific protein 2* ; SAM : *Sterile α -Motif* ; SxIP : *Ser-x-Ile-Pro* ; TM : *Transmembrane domain*), ainsi que les partenaires de SLAIN1/2 (d'après Akhmanova and Steinmetz, 2010 ; van der Vaart *et al.*, 2011).

Les protéines SLAIN1/2 ou Sentin chez la drosophile, sont des +TIPs qui ont récemment été identifiées comme des régulateurs de la dynamique des MTs (van der Vaart *et al.*, 2012). Cette nouvelle +TIP s'associe avec les protéines EBs, CLASPs, CLIPs et ch-TOG (van der Vaart *et al.*, 2011). Elle lie donc les extrémités (+) des MTs indirectement en se liant majoritairement aux protéines EB, mais aussi à d'autres +TIPs, comme ch-TOG (van der Vaart *et al.*, 2012).

Structurellement, SLAIN1/2 possède un domaine de dimérisation (*coiled-coil*) en N-terminal, une région riche en sérines au centre et un motif SxIP en C-terminal (cf. Figure 69). La partie N-terminal de SLAIN2 interagit avec le domaine C-terminal de ch-TOG, tandis que la partie C-terminal de SLAIN2 interagit avec EB1, CLASPs et CLIP-170 via notamment son motif SxIP. Le complexe SLAIN/ch-TOG ainsi formé est recruté au niveau des extrémités (+)

des MTs par les protéines EBs (**van der Vaart et al., 2011 ; van der Vaart et al., 2012 ; cf. Figure 69**).

Les SLAINs/Sentin assurent une croissance microtubulaires persistante en recrutant la polymérase ch-TOG/XMAP215 au niveau des bouts (+) des MTs, aussi bien dans les cellules de mammifères (**van der Vaart et al., 2011**), que chez la drosophile (**Li et al., 2011**). Par ailleurs, les protéines SLAIN1/2 ont un rôle dans le développement neuronal. En effet, la destruction du complexe SLAIN/ch-TOG dans des cellules primaires de neurones de l'hippocampe de rat perturbe la croissance des MTs en augmentant la fréquence de catastrophe et inhibant l'extension de l'axone pendant le développement neuronale (**van der Vaart et al., 2012**). Pendant la mitose, SLAIN2 est phosphorylée et son interaction avec les protéines EBs et ch-TOG est inhibée. Cependant, la destruction du complexe SLAIN2/ch-TOG à un effet primordial sur la croissance et l'organisation des MTs en interphase, mais n'affecte pas la progression du cycle cellulaire, indiquant que la dynamique des MTs n'est pas contrôlée de la même manière pendant la mitose (**van der Vaart et al., 2011**).

La protéine MACF1 (*Microtubule Actin Crosslinking Factor 1*), précédemment connue comme ACF7 (*Actin Crosslinking Family 7*), est une grosse protéine de 608 kDa, qui s'associe aussi bien avec les microfilaments d'actine et les microtubules (**Leung et al., 1999 ; Sun et al., 2001**). Cette +TIP est reliée à la famille de la plakine ainsi qu'à la famille de la spectrine. Structuellement, MACF est divisée en trois domaines. Dans sa partie N-terminale, elle possède un domaine globulaire plakine lui permettant de se lier à l'actine et deux domaines CH (*Calponin Homology*) lui permettant de se lier aux MTs (**Karakesisoglou et al., 2000**). Au centre, il y a un long domaine composé de répétitions de spectrine facilitant la liaison à l'actine, tandis que dans sa partie C-terminal, MACF1 possède deux motifs EF (*calmodulin-like*), liant le calcium, une région GAS2/GAR, qui est homologue à deux protéines, GAR22 et GAS2 (*Growth-arrest-specific protein 2*), ainsi qu'un motif SxIP pouvant lier EB1 (**Leung et al., 1999 ; Sun et al., 2001 ; cf. Figure 69**). MACF1 peut aussi se lier aux MTs via sa partie C-terminale, contenant au moins deux régions de liaison aux microtubules, la région GAS2 et un domaine SxIP entouré d'une région riche en sérine et proline. Ces domaines agissent de concert afin de stabiliser les MTs, notamment lors d'un traitement au nocodazole (**Sun et al., 2001**).

La protéine STIM1 (*Stromal Interaction Molecule 1*) est une protéine transmembranaire de 77 kDa, qui se localise principalement dans la membrane du réticulum endoplasmique (RE) (**Liou et al., 2005 ; Roos et al., 2005 ; Wu et al., 2007**). Elle est considérée comme un capteur du Ca^{2+} , du fait de son rôle essentiel dans l'entrée du calcium dans le RE. STIM1 agit également dans le remodelage du RE (**Putney, 2007 ; Wu et al., 2007 ; Grigoriev et al., 2008**). Dans les cellules de mammifères, les protéines STIMs sont codées par deux gènes, *Stim1* et *Stim2* (**Putney, 2007**). Dans sa partie N-terminale et au centre, STIM1 possède une variété de domaines fonctionnels prédits pour interagir avec d'autres protéines, incluant un motif EF (*calmodulin-like*), un motif SAM (*Sterile α -Motif*), un domaine *coiled-coil*, ainsi que des régions riches en sérines et prolines, et en lysines (**Wu et al., 2007 ; cf. Figure 69**). En plus de ces domaines, dans sa partie C-terminale, STIM1

contient un motif SxIP, lui permettant notamment d'interagir avec EB1 afin de stimuler l'extension du RE (**Wu et al., 2007 ; Grigoriev et al., 2008 ; cf. Figure 69**).

Afin d'identifier de nouvelles protéines +TIPs (cf. **Tableau 4**), les scientifiques ont cherchés de nouveaux partenaires d'EB1 et des protéines présentant des domaines SxIP conservés (**Akhmanova and Steinmetz, 2008 ; Honnappa et al., 2009**). Parmi ces nouvelles +TIPs, certaines ne semblent pas interagir directement avec les protéines EBs, comme l'astrine et la kinastrine, mais elles se localisent quand même au niveau des extrémités (+) des MTs (cf. **Tableau 4**).

Nom et classe protéique	Rôle(s)	Partenaires protéiques identifiées	Références
Tastine (protéine cytosolique)	Régulation de l'organisation du fuseau mitotique	Dynéine/dynactine (cf. page 116) Kinésine KIF2A (cf. page 121)	Jiang et al., 2012 ; Zhang et al., 2013
DDA3 (protéine cytosolique)	Régulation de l'organisation du fuseau mitotique Stabilisation des extrémités (+) des MTs au niveau du cortex cellulaire, régulant la migration cellulaire	Dynéine/dynactine (cf. page 116) Kinésine KIF2A (cf. page 121) EB1	Jiang et al., 2012 ; Zhang et al., 2013
TTBK1 et TTBK2 (<i>Tau-Tubulin Kinase 1/2</i>) (kinases)	Phosphorylation de Tau associé au MT	Tau (cf. page 76)	Sato et al., 2006 ; Houlden et al., 2007
AMER1 (FAM123A) AMER2 (<i>APC Membrane Recruitment 1/2</i>) (protéines membranaires)	Régulation de la distribution subcellulaire d'APC entre la membrane et les MTs Régulation de la morphogénèse cellulaire dépendante d'APC, en contrôlant la migration et l'adhérence cellulaire	APC (domaine répété Arm) (cf. page 103)	Grohmann et al., 2007
Astrine et kinastrine (MAPs mitotiques non-motrices)	Association aux extrémités (+) des MTs via la kinastrine Complexe astrine/kinastrine favorise la polymérisation du MT, probablement en stabilisant les extrémités (+) Complexe astrine/kinastrine facilite l'alignement des chromosomes pendant la mitose		Mack and Compton, 2001 Dunsch et al., 2011

Tableau 4 : Regroupement des nouvelles +TIPs identifiées en recherchant des interactants des protéines EBs.

H – Les mécanismes de localisation des +TIPs

Afin de former des comètes aux extrémités (+) en croissance du MT, les +TIPs emploient différents mécanismes, dérivant notamment de leur comportement d'accumulation au niveau des extrémités (+). En effet, les +TIPs sont capables de se lier directement à la tubuline libre, ou de s'incorporer dans les microtubules, ou encore de se lier indirectement aux MTs via d'autres facteurs (**Ferreira et al., 2014 ; cf. Figure 70**). D'ailleurs, une même +TIP peut utiliser plusieurs de ces différents mécanismes de localisation aux microtubules. Par exemple, dans les cellules de mammifères, APC peut se lier aux extrémités (+) de manière dépendante d'EB1 (**Slep et al., 2005**) ou de manière autonome (**Kita et al., 2006**), ou encore en s'associant à la kinésine-2 (**Jimbo et al., 2002**). Un autre exemple est l'accumulation de

CLIP-170 aux extrémités (+), chez la levure, qui dépend des moteurs moléculaires (Busch *et al.*, 2004 ; Carvalho *et al.*, 2004), tandis que dans les cellules humaines CLIP-170 présente un mécanisme de « *treadmilling* » en se liant directement aux microtubules (Perez *et al.*, 1999).

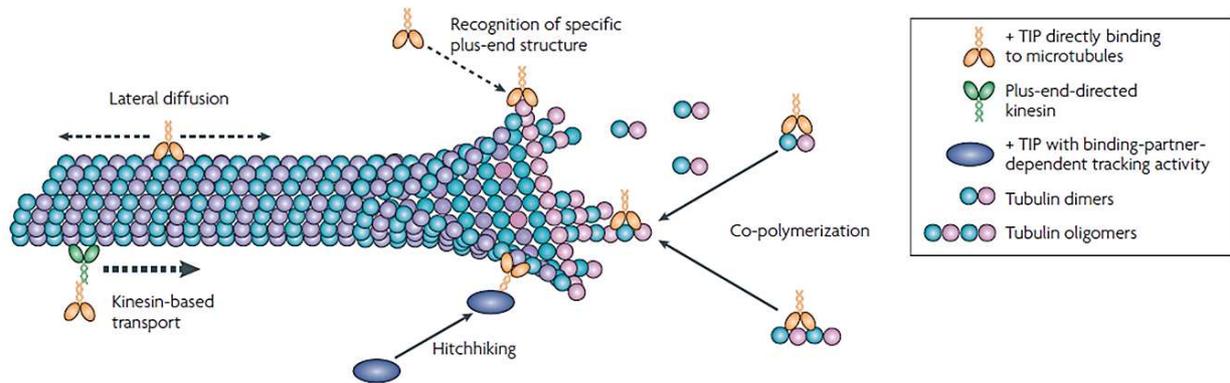


Figure 70 : Localisation des +TIPs. Les +TIPs s'accumulent au niveau des extrémités (+) des MTs soit directement en interagissant avec les MTs (en bleu et violet), soit indirectement en s'associant à d'autres +TIPs (en bleu) étant capables de lier la tubuline (Akhmanova and Steinmetz, 2008).

Nous avons vu précédemment que les +TIPs peuvent lier les extrémités (+) en croissance des MTs grâce à leurs domaines CH (*Calponin Homology*), TOG(L) (*Tumor Overexpressed Gene-(Like)*) et CAP-Gly (*Cytoskeletal-Associated Protein Glycine-rich*), ainsi que les motifs SxIP et LxxPTPh, en interagissant avec les protéines EBs (Lansbergen and Akhmanova, 2006 ; Kumar *et al.*, 2017 ; cf. Figure 71).

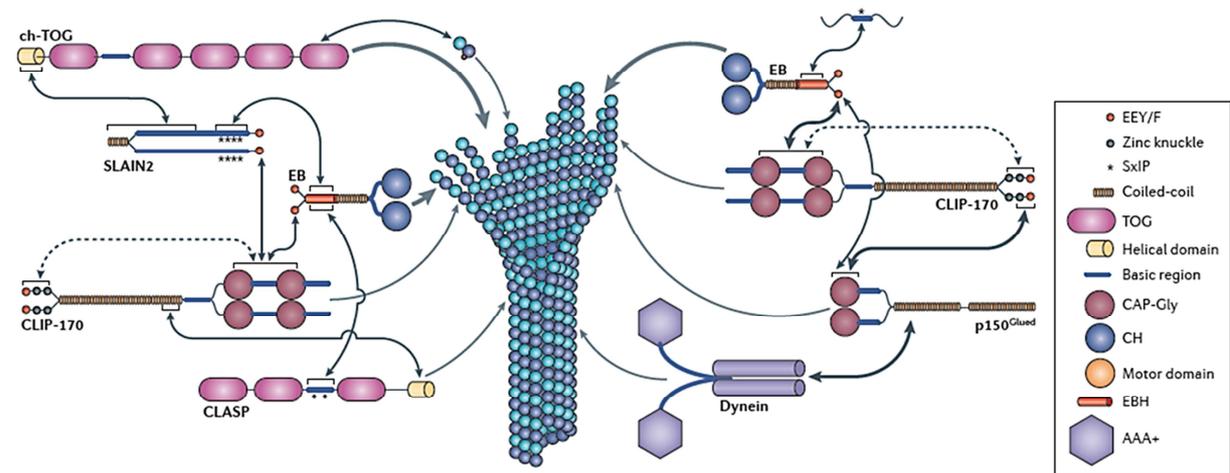


Figure 71 : Réseau d'interaction entre les +TIPs EB1, chTOG, CLIP-170, CLASP, p150^{Glued}, Dyneine et SLAIN2. Les +TIPs se lient soit directement aux microtubules via leurs domaines CH, TOG ou CAP-Gly, soit indirectement en interagissant avec les protéines EBs via des domaines CAP-Gly, ou des motifs SxIP, ou LxxTPh (non représenté) (Akhmanova and Steinmetz, 2015).

En plus des domaines d'interaction directement avec les MTs ou indirectement via d'autres +TIPs, les +TIPs peuvent utiliser le mécanisme de "treadmilling" pour s'accumuler au niveau des extrémités (+) des MTs (cf. Figure 72-A). Dans le mécanisme de « *treadmilling* », les +TIPs co-polymérisent avec la tubuline, et/ou elles reconnaissent et s'associent directement avec l'extrémité (+) du microtubule, du fait qu'elle a une

conformation particulière, et qu'elle contient de la tubuline GTP (**Galjart and Perez, 2003** ; cf. **Figure 72-A**). Les +TIPs, utilisant ce mécanisme, ont une affinité plus importante pour les sous-unités libres de tubuline-GTP et le polymère GTP, que le polymère GDP. En effet, certaines +TIPs, comme CLIP-170 peuvent directement se lier aux sous-unités de la tubuline (**Arnal et al., 2004** ; **Folker et al., 2005**). Ces protéines co-polymérisées avec la tubuline à l'extrémité (+) du MT se dissocient rapidement de la partie la plus âgée du microtubule, au fur à mesure qu'il grandit (**Akhmanova and Hoogenraad, 2005**). L'affinité des +TIPs envers les MTs âgés peut être réduite du fait que l'hydrolyse du GTP de la β -tubuline peut induire des changements conformationnels, tels que la fermeture du feuillet de protofilaments. Par ailleurs, les +TIPs subissent des modifications post-traductionnelles, telles que des phosphorylations, qui peuvent influencer leur affinité avec les microtubules (**Galjart and Perez, 2003** ; cf. **page 133**). Cela peut induire, l'association préférentiellement des +TIPs avec les extrémités des microtubules, dans certaines zones cellulaires, telles que le front de migration des cellules mobiles.

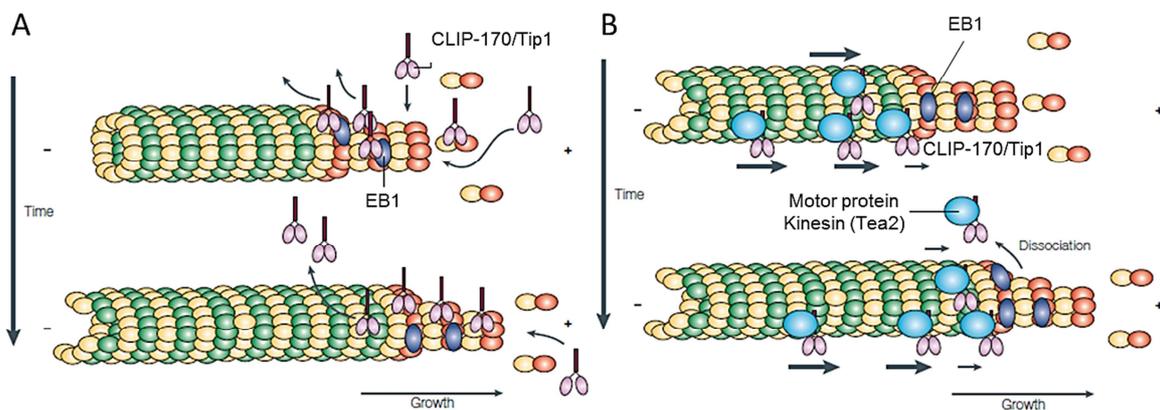


Figure 72: Mécanisme de localisation des +TIPs au niveau des extrémités (+) en croissance des microtubules. **(A)** Mécanisme de « treadmilling ». CLIP-170 (en violet) et EB1 (en bleu) se lient avec une grande affinité aux extrémités (+) du microtubule pendant la polymérisation, mais des changements structurels après l'assemblage des sous-unités de tubuline (hydrolyse du GTP) induisent leur détachement rapide à l'arrière de la comète. **(B)** Mécanisme dépendant de moteurs moléculaires. Les protéines Tip1 de levure (en violet) en s'associant avec les protéines motrices, comme la kinésine (en bleu) vont pouvoir atteindre l'extrémité (+) du microtubule en ayant voyagé le long de ce dernier. Une fois arrivée à l'extrémité (+), les complexes +TIPs/moteurs protéiques peuvent se dissocier de l'extrémité du microtubule. D'autres +TIPs, les protéines EB (en bleu foncé) peuvent être des régulateurs de l'activité du moteur de la kinésine (en bleu) au niveau de l'extrémité (+) des microtubules (**Galjart, 2005**).

De manière alternative, les +TIPs peuvent se lier à la *lattice* du microtubule et migrer le long de ce dernier afin d'atteindre l'extrémité (+), soit par diffusion, soit via des moteurs moléculaires. Le système de localisation dépendant des moteurs moléculaires, nécessite l'action de kinésines (cf. **page 121**) qui les transportent vers l'extrémité (+) (**Akhmanova and Steinmetz, 2010** ; **Ferreira et al., 2014** ; cf. **Figure 72-B**). Dans ce mécanisme, les exemples les plus étudiés sont les protéines CLIP-170 de levure, Tip1 et Bik1. En effet, ces protéines sont transportées et concentrées à l'extrémité (+) du MT grâce à l'action motrice des kinésines-7, Tea2 et Kip2 respectivement (**Busch et al., 2004** ; **Carvalho et al., 2004** ; **Bieling et al., 2007**). Chez les mammifères, la localisation d'une +TIP par un moteur moléculaire s'élève à un seul exemple, le transport de l'APC. Cette +TIP est transportée et

s'accumule aux extrémité (+) des MTs via la kinésine-2 (**Jimbo et al., 2002**). Dans ce mécanisme, l'accumulation aux extrémités (+) des MTs est possible que si la vitesse du moteur moléculaire est plus importante que celle du cycle de polymérisation/dépolymérisation des microtubules (**Busch et al., 2004 ; Carvalho et al., 2004**). Cependant, l'action des kinésines seule n'est pas suffisante pour maintenir les +TIPs sous forme de comète, un mécanisme de rétention de ces protéines est également impliqué (**Galjart and Perez, 2003**). Effectivement, les kinésines associées avec leurs +TIPs partenaires pourront former une comète sur les extrémités (+) des MTs seulement si elles ne se détachent pas immédiatement des extrémités des MTs. Cette rétention peut se faire grâce à leurs interactions avec des +TIPs, comme EB1 ou via leurs propriétés intrinsèques de ciblage des extrémités (**Varga et al., 2009**).

III – Les protéines MAPs motrices et le transport des cargaisons

Les MAPs motrices, dynéine cytoplasmique et les kinésines sont des moteurs moléculaires qui peuvent se mouvoir le long des MTs, généralement de manière unidirectionnelle, en utilisant l'énergie libérée par l'hydrolyse de l'ATP (**Malik and Gross, 2004**). Sinon, elles sont impliquées dans la répartition des organites/molécules dans le cytoplasme, mais aussi l'organisation du réseau microtubulaire (**Malik and Gross, 2004**).

A – Les dynéines

La dynéine cytoplasmique est un moteur moléculaire d'environ 1,2 MDa. C'est la MAP motrice majeure de transport rétrograde, dirigé vers les extrémités (-) des MTs et ceci sur de longues distances. Il transporte une grande variété de cargaison, allant d'ARN messagers à des organites entiers (**Malik and Gross, 2004**).

Des analyses phylogénétiques ont permis d'identifier deux familles de dynéines cytoplasmiques, mais aussi sept familles de dynéines axonémales, qui permettent le mouvement des cils et flagelles des cellules eucaryotes. Les dynéines sont absentes chez les plantes (**Wickstead and Gull, 2007**). Ici, on s'intéresse à la dynéine cytoplasmique retrouvée dans toutes les cellules.

Du fait de leur rétention au niveau des extrémités (+), les dynéines font partie de la grande famille des +TIPs, vues précédemment (cf. **page 87**).

A1 – Structure de la dynéine

Structurellement, la dynéine possède deux chaînes lourdes (HCs) d'environ 500 kDa, deux chaînes intermédiaires (ICs) et légères intermédiaires (LICs), ainsi que trois chaînes légères (LCs) (cf. **Figure 73**).

Le domaine moteur (de 380 kDa, et d'environ 3000 acides aminés) est contenu dans la chaîne lourde. Il est composé de six domaines ATPase AAA (*ATPase Associated with various cellular Activities*) arrangés en un anneau hexamérique duquel sort une tige (*linker*) constituée de brins antiparallèles surenroulés se terminant par le site de liaison aux MTs (*stalk*) (d'environ 125 acides aminés) (**Roberts et al., 2013 ; Cianfrocco et al., 2015 ; cf. Figure 73**). Ce site de liaison aux MTs est constitué d'un faisceau de six hélices α (**Kon et al., 2009**).

Le domaine moteur est à l'origine du mouvement mécanique, de traction, grâce à l'hydrolyse de l'ATP, basée sur un cycle mécano-chimique (**Imamula et al., 2007**). La queue N-terminale de la chaîne lourde permet la régulation de la protéine, par homodimérisation via un domaine *coiled-coil* et contient les sites de fixation aux deux chaînes intermédiaires (ICs) et légères intermédiaires (LICs) qui permettent le recrutement des cargaisons (**Oiwa and Sakakibara, 2005 ; Dodding and Way, 2011 ; Robert et al., 2013 ; Cianfrocco et al., 2015 ; Jha and Surrey, 2015 ; cf. Figure 73**).

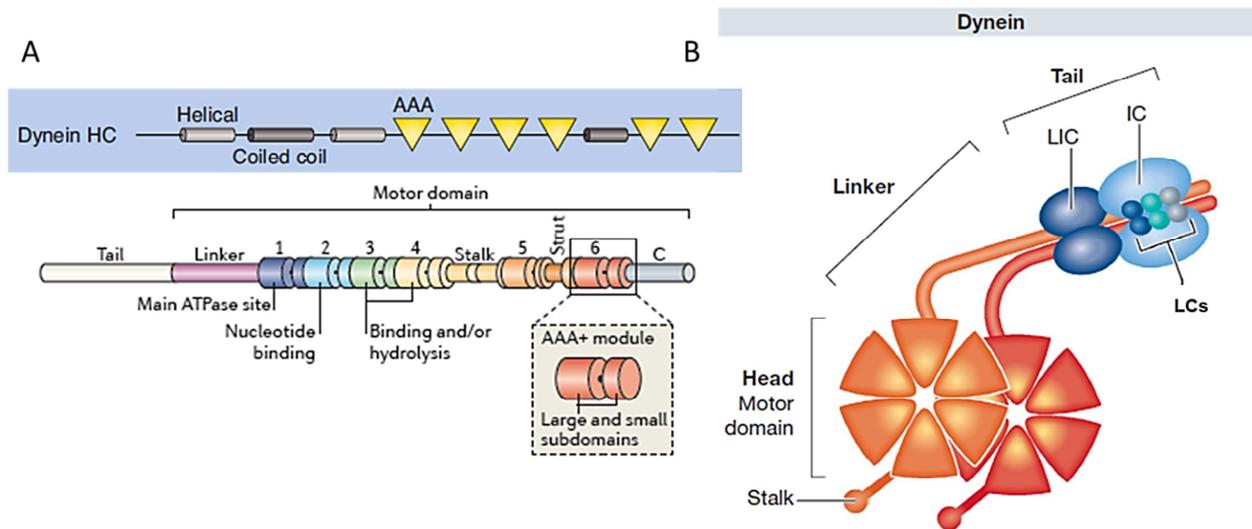


Figure 73 : Structure de la dynéine cytosolique. (A) Agencement des domaines dans la chaîne lourde de la dynéine (AAA 1 à 6 : *ATPase family Associated with various cellular Activities*) (d'après **Akhmanova and Steinmetz, 2010 ; Robert et al., 2013**). (B) Structure tertiaire de la dynéine. Le domaine moteur (avec les six domaines ATPase) est contenu dans les chaînes lourdes (en orange). Ces dernières s'associent aux chaînes intermédiaires (ICs) et légères intermédiaires (LICs) (en bleu). Le « *stalk* » correspond au domaine de liaison aux MTs. Les deux chaînes intermédiaires (ICs) interagissent avec trois paires de chaînes légères (LCs) (**Dodding and Way, 2011**).

A2 – Régulateurs majeurs du recrutement des cargaisons et de l'activité motrice de la dynéine cytoplasmique

La dynéine joue un rôle important dans le transport rapide assurant la polarité cellulaire, notamment dans les axones, ainsi que le mouvement d'organites (appareil de Golgi, centrosome, enveloppe nucléaire, kinétochores, lysosome et endosome tardif) et des adénovirus (**Tsai et al., 2007 ; Vallee et al., 2012 ; Roberts et al., 2013 ; cf. Figure 74**). Ainsi, la dynéine a un rôle important pendant la mitose, en assurant la ségrégation des chromosomes via le transport des kinétochores (**Roberts et al., 2013**). Afin de mener à bien ses rôles en assurant le transport de ces différentes cargaisons, la dynéine est associée à des facteurs clés régulant son interaction avec les cargaisons et de sa fonction motrice, telles que la dynactine, LIS1 et Ndel1/Nde1 (cf. **Figure 74**).

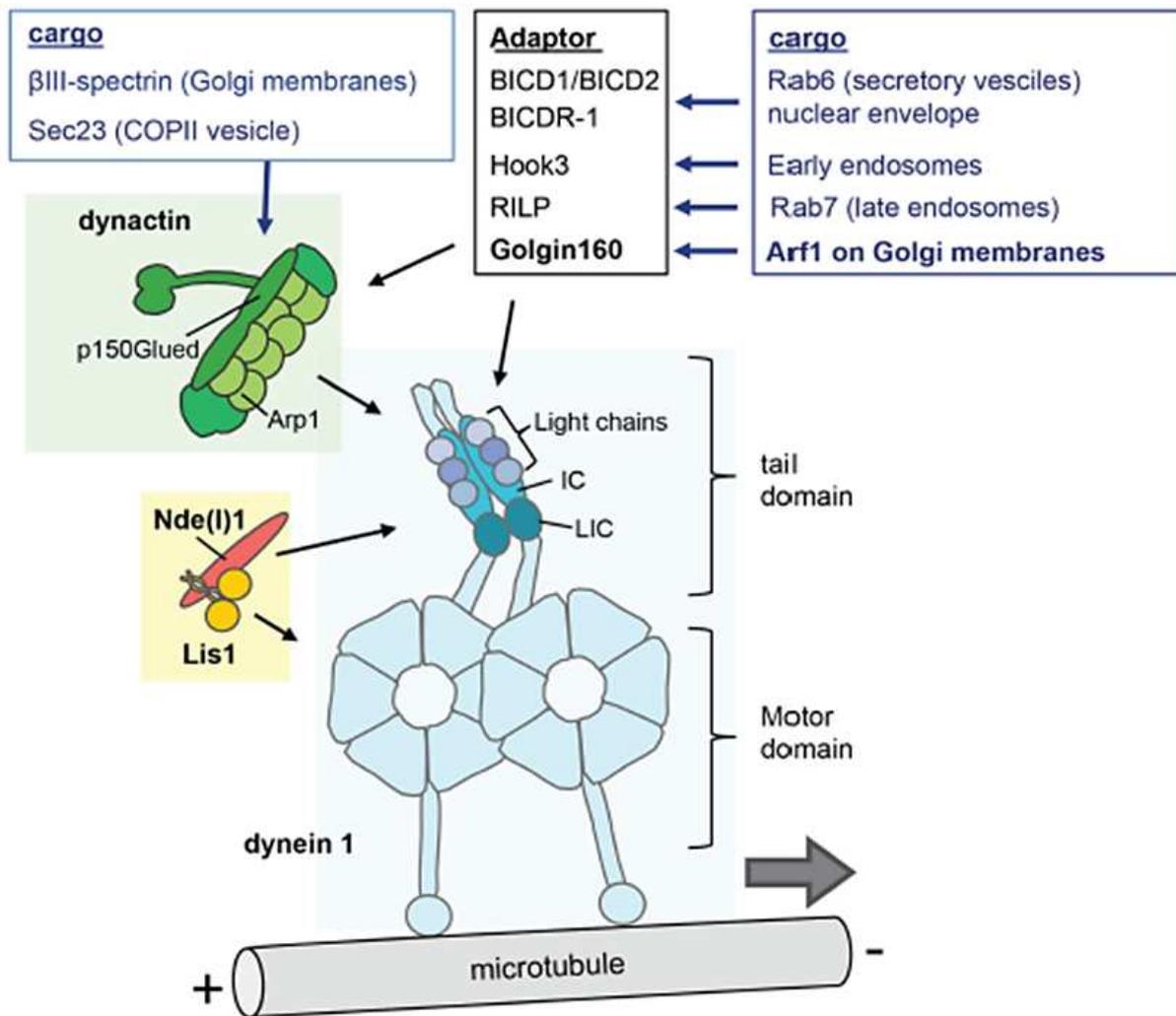


Figure 74 : Régulateurs de la dynéine cytoplasmique. Pour augmenter son efficacité de transport, la dynéine interagit avec la dynactine (en vert) ou LIS1/Nde(l)1 (en orange/rouge). Ces facteurs régulent l'interaction du moteur moléculaire avec ses cargaisons, ainsi que sa fonction motrice. En plus, la dynéine possède des adaptateurs (encadré en noir) qui régulent ses interactions avec des cargaisons spécifiques (encadré en bleu), en interagissant soit directement avec la dynéine, soit indirectement via la dynactine (Jaarsma and Hoogenraad, 2015).

La dynéine possède également plusieurs protéines adaptatrices, permettant de relier spécifiquement le complexe dyneine/dynactine aux organites à transporter (cf. **Tableau 5**). Parmi celles-ci, il y a BICD2 (*Bicaudal D2*) qui assure la liaison de la dynéine avec des vésicules entourées de Rab6, l'enveloppe nucléaire, ou des particules virales en co-recrutant la dynéine et la dynactine et formant un complexe tertiaire stable pour initier le mouvement vers l'extrémité (-) (Jaarsma and Hoogenraad, 2015 ; cf. **Figure 74**).

Protéines adaptatrices	Régulateurs des protéines adaptatrices	Organites transportées
RILP (association à la sous-unité p150 ^{Glued} de la dynactine)	GTPase (Rab7) Senseur du cholestérol (ORP1L)	Endosomes tardifs et lysosomes
SNX6 (association à la sous-unité p150 ^{Glued} de la dynactine)	Senseur lipidique (PI4P)	Vésicules associées au rétromère (complexe protéique jouant un rôle central dans le trafic endosomal)
Milton/TRACK (association à la sous-unité p150 ^{Glued} de la dynactine)	Senseur du calcium (Miro) Phosphorylation / dégradation (PINK/Parkin)	Mitochondries
Huntingtin (association à la dynéine via DIC et la sous-unité p150 ^{Glued} de la dynactine via HAP1 (<i>Huntingtin-Associated Protein 1</i>))	Phosphorylation (Akt)	Endosomes, lysosomes, autophagosomes, vésicules APP ou BDNF-positives, récepteurs GABA, ARN
La (association à la dynéine via DIC)	Sumoylation	ARN
JIP3/JIP4 (association à la sous-unité p150 ^{Glued} de la dynactine et à la dynéine via DLIC)	GTPase (ARF6)	Endosomes, vésicules apoptotiques
JIP1 (association à la sous-unité p150 ^{Glued} de la dynactine)	Phosphorylation (JNK) Dégradation	Vésicules APP-positives, autophagosomes, vésicules synaptiques, mitochondries
Hook (association à la dynéine)		Endosomes précoces
BicD1/2		Vésicules Rab6-positives, appareil de Golgi, vésicules cytoplasmiques, ARN

Tableau 5 : Regroupement des protéines adaptatrices du complexe dynéine/dynactine assurant une spécificité de substrat au complexe moteur (d'après **Maday et al., 2014** ; **Fu and Holzbaur, 2014**).

A2a – Le complexe macromoléculaire dynéine/dynactine

La dynéine fonctionne avec le complexe multiprotéique, dynactine. Celui-ci augmente la processivité du moteur, en constituant un point d'appui supplémentaire sur le MT (**Roberts et al., 2013** ; **Chowdhury et al., 2015** ; **Reck-Peterson, 2015** ; **Jha and Surrey, 2015** ; cf. **Figure 75-A**). Il est constitué de différentes protéines : Arp1 et Arp11, formant un filament de type actine et CapZ α -CapZ β , ainsi que différentes sous-unités p25, p27, p50, p62, p150 regroupées sous forme de complexes. La grande sous-unité p150^{Glued} est une protéine +TIP (cf. **page 106**), elle est constituée d'un domaine CAP-Gly à son extrémité N-terminale et de deux régions *coiled-coil* qui sont nécessaire pour la dimérisation et l'interaction avec la chaîne intermédiaire (IC) de la dynéine (**King et al., 2003** ; **Reck-Peterson, 2015** ; cf. **Figure 75-B**). La sous-unité p150^{Glued} de la dynactine assure le recrutement du complexe dynéine/dynactine sur les extrémités (+) des MTs, en interagissant avec EB1 ou CLIP-170 (**Cianfrocco et al., 2015** ; cf. **Figure 75-C**).

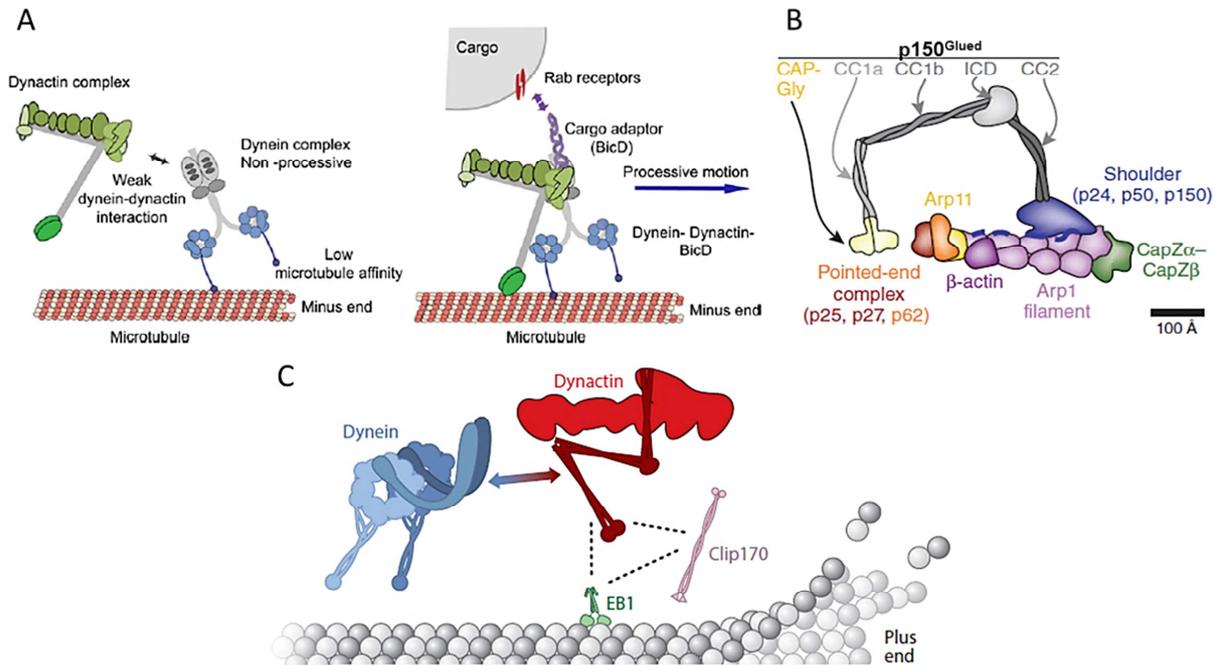


Figure 75 : Le complexe dynéine/dynactine. (A) Lorsque la dynéine cytoplasmique interagit avec la dynactine et une protéine adaptatrice assurant la liaison à des cargaisons, telle que BicD2, la processivité du moteur moléculaire est augmentée grâce aux domaines CAP-Gly (en vert) de p150^{Glued} qui lie les MTs (d'après **Jha and Surrey, 2015**). (B) Structure de la dynactine. Elle est constituée d'un filament formé par les protéines Arp1 et β-actine qui est entouré d'Arp11 et des protéines de coiffe CapZα-CapZβ. Les sous-unités p25, p27 et p62 forment le complexe « *pointed-end* » qui se lie à Arp11, tandis que les sous-unités p24 et p50 forment le complexe « *shoulder* », ainsi qu'une grande sous-unité p150^{Glued} qui présente trois domaines *coiled-coil* (CC) et un domaine CAP-Gly (d'après **Reck-Peterson, 2015**). (C) Mécanisme de recrutement du complexe dynéine/dynactine sur les extrémités (+) des microtubules via l'interaction de p150^{Glued} avec EB1 et CLIP-170 (d'après **Cianfrocco et al., 2015**).

A2b – LIS1

La protéine LIS1 (*Lissencephaly 1*) a été décrite pour la première fois chez des enfants atteints de lissencéphalie de type I, ayant un développement neuronale défectueux. La délétion de LIS1 conduit à des défauts sévères lors du développement neuronale humain (**Dobyns et al., 1993 ; Vallee et al., 2001**). Depuis, des homologues ont été identifiés, chez la levure *S. cerevisiae* (**Geiser et al., 1997**), le vers *C. elegans* (**Dawe et al., 2001**) et la drosophile *D. melanogaster* (**Sheffield et al., 2000**). Cette protéine est un régulateur clé et conservé de la dynéine. En effet, LIS1 peut agir sur l'activité motrice de la dynéine en participant au recrutement et au maintien du moteur moléculaire au niveau des extrémités (+) des MTs, mais aussi en aidant à initier le chargement des cargaisons et le trafic intracellulaire, ainsi qu'en aidant la dynéine à transporter de grosses cargaisons vers les extrémités (-) des MTs (**Cianfrocco et al., 2015 ; cf Figure 76-A**). Plus précisément, LIS1 possède deux modes opposés de régulation de l'activité de la dynéine, en agissant aussi bien négativement que positivement sur l'affinité du moteur moléculaire pour les MTs. Ces deux régulations opposées dépendantes de la stoechiométrie de liaison entre LIS1 et la dynéine qui est régulée par le domaine AAA3 du moteur moléculaire (**De Santis et al., 2017**).

Au niveau structurel, LIS1 possède trois régions distinctes (cf. **Figure 76-B, C**). La partie N-terminale possède un motif LisH (*LIS1 Homology*), qui est retrouvé dans plus de 100

protéines eucaryotes (Kim *et al.*, 2004 ; Cianfrocco *et al.*, 2015). Juste après, une région *coiled-coil* est prédite. Cette région avec le motif LisH est impliquée dans la dimérisation de la protéine (Tai *et al.*, 2002). Dans la partie C-terminale, il y a un domaine β -propeller formé de sept répétitions WD qui est important pour les interactions latérales avec d'autres protéines (Tarricone *et al.*, 2004). Par exemple, LIS1 interagit avec les domaines AAA3 et AAA4 de la dynéine, mais aussi avec la partie C-terminale de Nudel/NudE via son domaine β -propeller en C-terminal (Cianfrocco *et al.*, 2015).

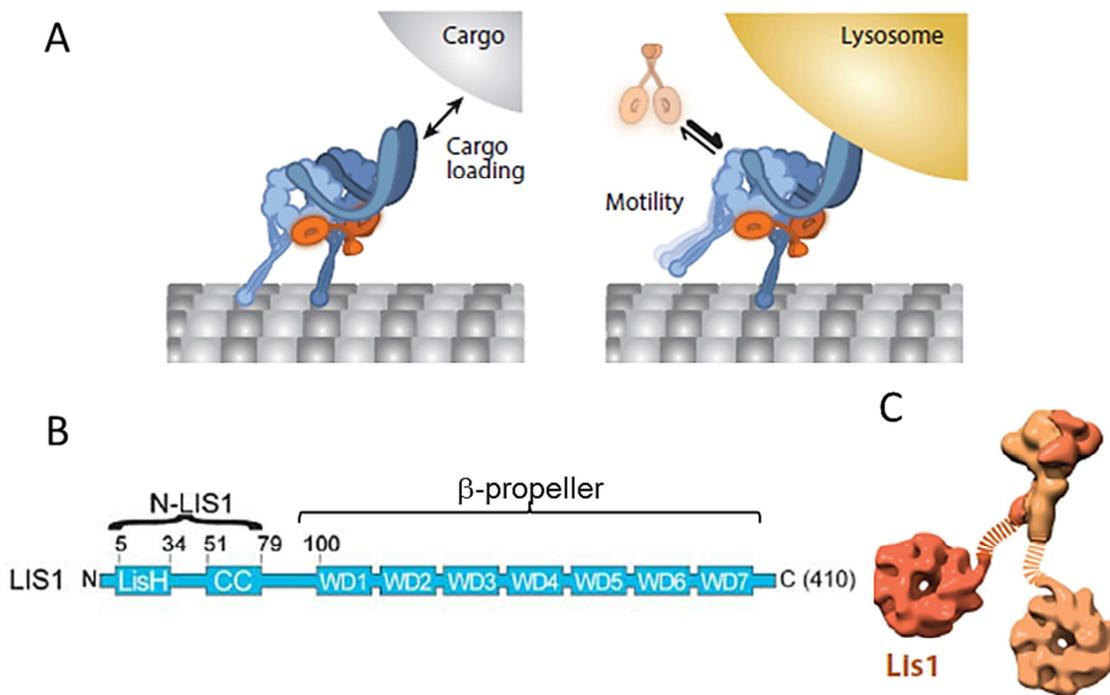


Figure 76 : Structure et fonction de LIS1. (A) Modèles des fonctions de LIS1. Elle est impliquée dans la rétention de la dynéine sur les extrémités (+) des microtubules et facilite le chargement des cargaisons, ainsi que l'initiation du trafic rétrograde (à gauche). LIS1 est aussi nécessaire au transport des cargaisons par la dynéine vers les extrémités (-) des microtubules (d'après Cianfrocco *et al.*, 2015). (B) Agencement des domaines structurels de LIS1. Dans sa partie N-terminale elle possède un domaine LisH (*LIS1 Homology*) et un domaine CC (*Coiled-Coil*) qui permettent l'homodimérisation de la protéine. Dans sa partie C-terminale, LIS1 a un domaine β -propeller contenant sept répétitions WD (motif d'environ 40 acides aminés) (d'après Tarricone *et al.*, 2004). (C) Structure tertiaire d'un dimère de LIS1 (numéro d'accèsion 1UUI dans la PDB), contenant un domaine de dimérisation en N-terminal (en haut), un domaine β -propeller en C-terminal (en bas) et des régions flexibles (lignes pointillées) connectant les deux domaines. Les deux monomères de l'homodimère LIS1 sont différenciables par deux couleurs (orange foncé ou orange clair) (d'après Cianfrocco *et al.*, 2015).

Malgré le fait que LIS1 soit une +TIP, elle ne se lie pas directement aux extrémités (+) des MTs. Elle cible les MTs, probablement en se liant via son domaine β -propeller à d'autres +TIPs, comme CLIP-170, la dynéine et la dynactine (Coquelle *et al.*, 2002 ; Tai *et al.*, 2002). Par ailleurs, cette +TIP participe au recrutement de la dynéine au niveau des extrémités (+) des MTs de manière dépendante de la kinésine en interagissant avec CLIP-170 (Cianfrocco *et al.*, 2015 ; cf. Figure 77). L'interaction de LIS1 avec la dynéine est importante pour réguler le transport rétrograde. En effet, en concurrençant l'interaction entre p150^{Glued} et CLIP-170, LIS1 peut libérer le complexe dynéine/dynactine des extrémités (+) des MTs décorées par CLIP-170 (Lansbergen *et al.*, 2004 ; Tai *et al.*, 2004 ; cf. Figure 77).

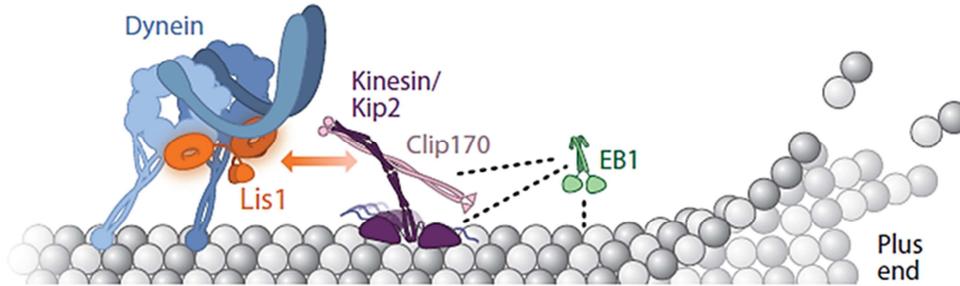


Figure 77 : Localisation de la dynéine au niveau des extrémités (+) des microtubules. La dynéine est transportée vers les bouts (+) des microtubules via la kinésine (Kip2 de levure) et CLIP-170 et EB1 améliorent la processivité de Kip2. Cette interaction est médiée par l'association de LIS1 avec CLIP-170 (d'après **Cianfrocco et al., 2015**).

La protéine LIS1 est particulièrement nécessaire pour le développement neuronal (**Dawe et al., 2001**). Elle intervient aussi dans la migration et le positionnement nucléaire, ainsi que dans la division cellulaire et plus spécifiquement dans l'orientation du fuseau mitotique et l'alignement des chromosomes, où elle agit de concert avec la dynéine cytoplasmique (**Vallee et al., 2001 ; Dawe et al., 2001**). Pendant la mitose, LIS1 est recrutée au niveau du cortex cellulaire et des kinétochores, de manière dépendante du complexe dynéine/dynactine (**Coquelle et al., 2002 ; Tai et al., 2002 ; Cianfrocco et al., 2015**). Le domaine β -propeller en C-terminal de LIS1 semble suffisante pour que la protéine cible les kinétochores (**Tai et al., 2002**). De plus, la surexpression de LIS1 interfère avec l'orientation du fuseau mitotique et donc la progression du cycle cellulaire, possiblement en déplaçant CLIP-170 des kinétochores (**Tai et al., 2002 ; Vallee et al., 2001**).

A2c – Ndel1/Nde1

Similairement à LIS1, les protéines Ndel1/Nudel, Nde1/NudE sont des régulateurs de la dynéine. Ce sont des dimères protéiques contenant un domaine *coiled-coil* de dimérisation (cf. **Figure 78**). Les parties N-terminales et C-terminales des protéines lie la dynéine, alors que le centre de la protéine interagit avec LIS1 (**Vallee et al., 2012 ; cf. Figure 78**).



Figure 78 : Structure de Ndel1/Nde1. Les protéines possèdent un domaine CC (*coiled-coil*) et un domaine non structuré. Les sites d'interaction avec des partenaires protéiques sont indiqués en noir (d'après **Vallee et al., 2012**).

Ces protéines régulatrices assurent le chargement sur le moteur moléculaire de diverses cargaisons, telles que l'enveloppe nucléaire, les kinétochores, les lysosomes, les endosomes tardifs et les adénovirus (**Vallee et al., 2012 ; Jaarsma and Hoogenraad, 2015**).

B – Les kinésines

La plupart des kinésines, aussi appelées KIFs (*Kinesin Family proteins*) ont une mobilité dirigée vers l'extrémité (+) des MTs, assurant ainsi le transport antérograde, vers la périphérie cellulaire. Quarante-cinq gènes de kinésines ont été identifiés dans le génome de la souris, avec des homologues retrouvés dans le génome humain (**Miki et al., 2001**). Les

kinésines de mammifères sont classées en quinze familles différentes, en fonction de leurs caractéristiques structurales (**Hirokawa *et al.*, 2009** ; cf. **Figures 79 et 80-A**). Parmi ces kinésines, trente-huit sont exprimées dans le cerveau (**Miki *et al.*, 2001**).

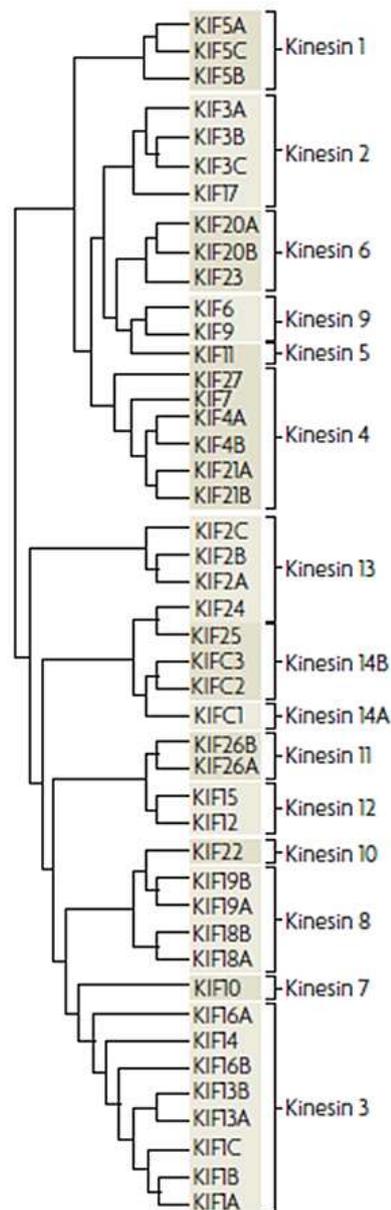


Figure 79 : Arbre phylogénétique des quarante-cinq gènes de kinésines chez la souris, regroupés en quinze familles (**Miki *et al.*, 2001** ; **Hirokawa *et al.*, 2009**).

Comme les dynéines, les kinésines en transportant des cargaisons via les MTs sont impliquées dans plusieurs fonctions cellulaires, telles que l'organisation du cytosquelette microtubulaire lors de l'interphase, le transport axonal dans les cellules nerveuses, le mouvement des organites, vésicules et molécules (protéines, ARN) dans le cytoplasme (**Hirokawa *et al.*, 2009** ; **Ferreira *et al.*, 2014**). Au moins douze kinésines sont connues pour jouer un rôle dans la mitose, notamment en assurant l'alignement ou la séparation des chromosomes, ou encore l'assemblage du fuseau mitotique (**Zhu *et al.*, 2005**). Ici, nous nous sommes intéressés à la kinésine-1 conventionnelle qui transporte des cargaisons dans les cellules en interphase.

B1 – Structure des kinésines et en particulier de la kinésine-1

Toutes les kinésines, même les non-motrices possèdent un domaine *coiled-coil* et un domaine moteur globulaire plus petit que celui de la dynéine qui est situé dans la chaîne lourde (cf. **Figure 80**). Les kinésines peuvent être regroupées en trois grandes familles en fonction du positionnement de leur domaine moteur (Miki *et al.*, 2001 ; cf. **Figure 80-A**). Ainsi, les kinésines de type N, aussi appelées kinésines conventionnelles (kinésines-1 à 12), possèdent leur domaine moteur dans leur partie N-terminale et ont une mobilité dirigée vers les extrémités (+) des MTs. Les kinésines type M (kinésine-13), possèdent un domaine moteur central. Ces kinésines se déplacent également vers l'extrémité (+) des MTs, mais certaines ne sont pas motrices. Enfin, les kinésines de type C (kinésines-14), possèdent leur domaine moteur en C-terminal et se déplacent vers les bouts (-) des MTs (Hirokawa *et al.*, 2009). En fonction de la famille de kinésine, ils peuvent avoir un domaine plus spécifique, comme un domaine CAP-Gly, un domaine PH (*Pleckstrin Homology*), un domaine PX (*Phox Homology*) ou un domaine constitué de répétitions WD40 (Hirokawa *et al.*, 2009 ; cf. **Figure 80-A**).

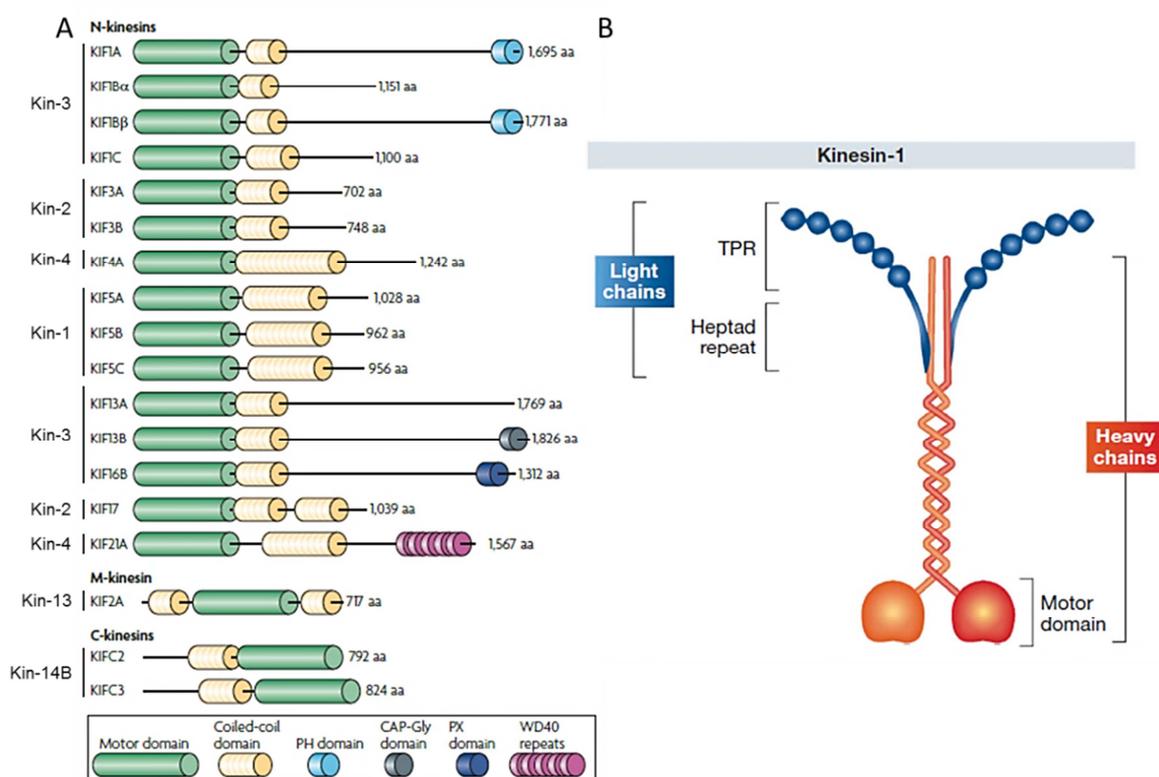


Figure 80 : Structure secondaire et tertiaire de certaines kinésines humaines (d'après Hirokawa *et al.*, 2009 ; Dodding and Way, 2011). (A) Les chaînes lourdes possèdent un domaine moteur et un domaine *coiled-coil*. En plus, elles ont soit un domaine PH, un domaine CAP-Gly, un domaine PX ou un domaine répété WD40. Les familles des kinésines sont indiqués à gauche (d'après Hirokawa *et al.*, 2009). (B) La kinésine-1 est un hétérodimère composé de deux chaînes lourdes contenant les domaines moteurs (en orange) et de deux chaînes légères (en bleu). Les chaînes légères sont associées avec les chaînes lourdes au niveau des régions répétées (*Heptad*). La partie C-terminale des chaînes légères est composée de six répétitions TPR (*Tetratricopeptide Repeats*) assurant l'interaction avec les cargaisons (Dodding and Way, 2011).

Les membres de la famille de la kinésine-1 (KIF5A, KIF5B, KIF5C) sont ubiquitaires et sont abondamment exprimés dans les cellules (Hirokawa and Noda, 2008 ; Hirokawa *et*

al., 2009). Structuellement, la kinésine-1 est une protéine hétérotétramérique, constituée d'un homodimère de deux chaînes lourdes, ou KHCs (*Kinesin Heavy Chains*) de 120 kDa et de deux chaînes légères ou KLCs (*Kinesin Light Chains*) de 64 kDa. Les chaînes légères font souvent, mais pas toujours parti du complexe (Maday *et al.*, 2014) et contrôlent l'activité du complexe, en fixant les cargaisons (Hirokawa *et al.*, 2009 ; cf. Figure 80-B). Le domaine moteur contenu dans la chaîne lourde est responsable de l'activité motrice, grâce à la fixation de l'ATP et son activité ATPasique (Vale and Fletterick, 1997). Il assure également la liaison aux MTs. Au centre de la protéine, il y a un domaine surenroulé *coiled-coil*, permettant la dimérisation des chaînes lourdes. La partie C-terminale se lie à deux chaînes légères, qui contiennent une région conservée, composée de six motifs répétés TPR (*Tetratricopeptide Repeats*). (Hirokawa *et al.*, 2009 ; cf. Figure 80-B).

B2 – Fonctions des kinésines

Les kinésines remplissent plusieurs fonctions spécifiques qui sont rassemblés dans les quatorze familles de kinésines (cf. Tableau 6).

Familles de kinésines	Fonctions identifiées
Kinésine-1 (KIF5A, KIF5B, KIF5C) Mobilité dirigée vers extrémités (+) des MTs	Transport conventionnelle, transport de vésicules
Kinésine-2 (KIF3A, KIF3B, KIF3C, KIF17)	Transport de vésicules
Kinésine-3 (KIF1A, KIF1B, KIF1C, KIF13A, KIF13B, KIF14, KIF16A, KIF16B) Remarque : KIF13B est une kinésine qui possède un domaine CAP-Gly	Transport d'organites Condensation et alignement des chromosomes, cytokinèse
Kinésine-4 (KIF27, KIF7, KIF4A, KIF4B, KIF21A, KIF21B) Chromokinésines Mobilité dirigée vers extrémités (+) des MTs	Transport d'organites Régulation de la dynamique microtubulaire : facteur de pause (KIF4) Condensation et mouvement des chromosomes, formation et organisation du fuseau mitotique en anaphase et cytokinèse
Kinésine-5 (KIF11) Kinésines mitotiques Mobilité dirigée vers extrémités (+) et (-) des MTs	Nucléation des MTs Formation du fuseau mitotique, séparation des centrosomes
Kinésine-6 (KIF20A, KIF20B, KIF23) Chromokinésines Mobilité dirigée vers extrémités (+) des MTs	Polarité du fuseau mitotique, cytokinèse
Kinésine-7 (KIF10, CENP-E) Mobilité dirigée vers extrémités (+) des MTs	Régulation de la dynamique microtubulaire : élongase (CENP-E) Capture des kinétochores sur les microtubules
Kinésine-8 (KIF18A, KIF18B, KIF19A, KIF19B) Mobilité vers extrémités (+) des MTs	Migration nucléaire et transport des mitochondries Régulation de la dynamique microtubulaire : dépolymérase (Kip3, KIF19) et facteurs de pause (KIF18A) Ségrégation des chromosomes (KIF18A)
Kinésine-9 (KIF6, KIF9)	
Kinésine-10 (KIF22) Mobilité dirigée vers extrémités (+) des MTs	Ségrégation et alignement des chromosomes via la génération des forces nécessaires
Kinésine-11 (KIF26A, KIF26B)	Transduction du signal
Kinésine-12 (KIF12, KIF15) Chromokinésines Mobilité dirigée vers extrémités (+) des MTs	Transport d'organites Régulation de la dynamique microtubulaire : supprime les catastrophes Assemblage et maintenance de la bipolarité du fuseau mitotique

Tableau 6 (début)

Kinésine-13 (KIF2A, KIF2B, KIF2C/MCAK, KIF24; KIF25) Kinésines non motrices	Régulation de la dynamique microtubulaire : dépolymérase (KIF2A, KIF2B, KIF2C/MCAK) Formation du fuseau mitotique bipolaire (KIF2A), dynamique des kinétochores augmentant la progression de la mitose (KIF2B), ségrégation et alignement des chromosomes (KIF2C/MCAK)
Kinésine-14A et B (KIFC1/HSET (<i>Human Speen, Embryonic tissue and Testes</i>), KIFC2, KIFC3) Mobilité dirigée vers extrémités (-) des MTs	Transport d'organites Régulation de la dynamique microtubulaire : dépolymérase (Kar-3). Nucléation des MTs Ségrégation des chromosomes, assemblage et contrôle de la longueur du fuseau mitotique, focalisation des pôles du fuseau mitotique, cytokinèse

Tableau 6 : Principaux rôles des membres des familles de kinésines (d'après **Miki et al., 2005 ; Rath and Kozielski, 2012 ; Sturgill and Ohi, 2013 ; Cross and McAinsh, 2014 ; Vicente and Wordeman, 2015 ; Drechsler and McAinsh, 2016 ; She and Yang, 2017**).

B2a – Implication des kinésines dans la dynamique des microtubules

Certaines kinésines peuvent réguler la dynamique des MTs, en contrôlant l'assemblage et/ou le désassemblage des MTs dans le but d'influencer leur organisation (cf. **Tableau 6**). Parmi les quatre-cinq kinésines codées par le génome humain, neuf sont connues pour réguler la dynamique des MTs, elles sont regroupées en trois classes basiques : les élongases, les facteurs de pause et les dépolymérase (Sturgill and Ohi, 2013 ; cf. **Figure 81**). Dans la classe des élongases, la CENP-E (kinésine-7), favorisant l'élongation des MTs est retrouvée. Les membres des familles des kinésine-4 (KIF4) et kinésine-8 (KIF18A) fonctionnent comme des facteurs de pause en atténuant l'assemblage des MTs. Les kinésines dépolymérase sont les plus étudiées et regroupent des membres des familles des kinésine-8 (Kip3), kinésine-13 (KIF2A, KIF2B, KIF2C/MCAK) et kinésine-14 (Kar-3, *Karyogamy protein 3*) (Sturgill and Ohi, 2013 ; Vicente and Wordeman, 2015 ; cf. **Figure 81**). Par ailleurs, certaines kinésines impactent indirectement la dynamique des MTs, comme par exemple la kinésine-1 qui favorise l'élongation des MTs en activant JNK et délivrant des facteurs d'assemblage aux extrémités (+) des MTs (Sturgill and Ohi, 2013).

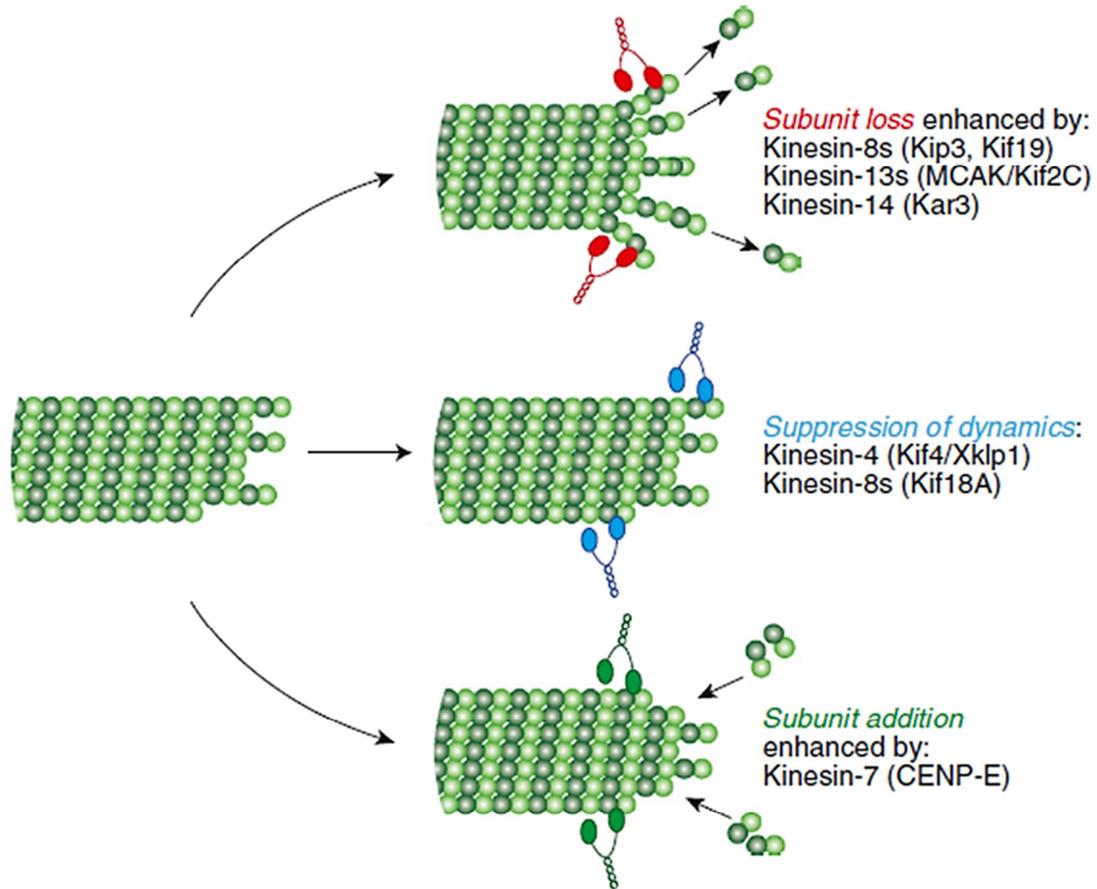


Figure 81 : Régulation de la dynamique des MTs par certaines kinésines. Les trois classes de kinésines régulatrices sont représentées : les dépolymérase (en rouge) augmentent le désassemblage des MTs, les élongases (en vert) favorisent l'assemblage des MTs et les facteurs de pause (en bleu) stabilisent les MTs (Sturgill and Ohi, 2013).

Chez les mammifères, la famille de la kinésine-13 est une famille non motrice qui inclut trois membres, à savoir KIF2A, KIF2B et KIF2C/MCAK (*Mitotic Centromere-Associated Kinesin*). Ces kinésines sont des dépolymérase car elles possèdent une activité de promotion des catastrophes dépendante de l'ATP et une activité de séquestration de la tubuline indépendante de l'ATP (Moores *et al.*, 2002 ; Newton *et al.*, 2004 ; van der Vaart *et al.*, 2009). La kinésine MCAK peut se lier *in vitro* aux extrémités (+) et (-) des MTs (Hunter *et al.*, 2003 ; Moore *et al.*, 2005), mais elle montre une plus grande affinité pour les protofilaments courbés à l'extrémité (+) des MTs (Moores *et al.*, 2002 ; cf. Figure 82-A), via une interaction directe avec EB1 via son motif SxIP (Lee *et al.*, 2008 ; cf. Figure 82-B). Ainsi, MCAK accélère le taux de catastrophe en déstabilisant les liens latéraux entre les protofilaments (Shipley *et al.*, 2004 ; cf. Figure 82-A). Il a été montré que MCAK peut retirer jusqu'à 20 sous-unités de tubuline avant de se détacher (Hunter *et al.*, 2003). Une autre kinésine-13, KIF2A est fortement exprimée dans les cellules neuronales (Noda *et al.*, 1995). Elle favorise les catastrophes au niveau du cortex cellulaire (van der Vaart *et al.*, 2009), sans se lier à EB1 (Moore *et al.*, 2005). Pendant la mitose, KIF2A et KIF2B sont majoritairement associés avec le centrosome, tandis que KIF2C/MCAK prédomine au niveau des kinétochores (Manning *et al.*, 2007).

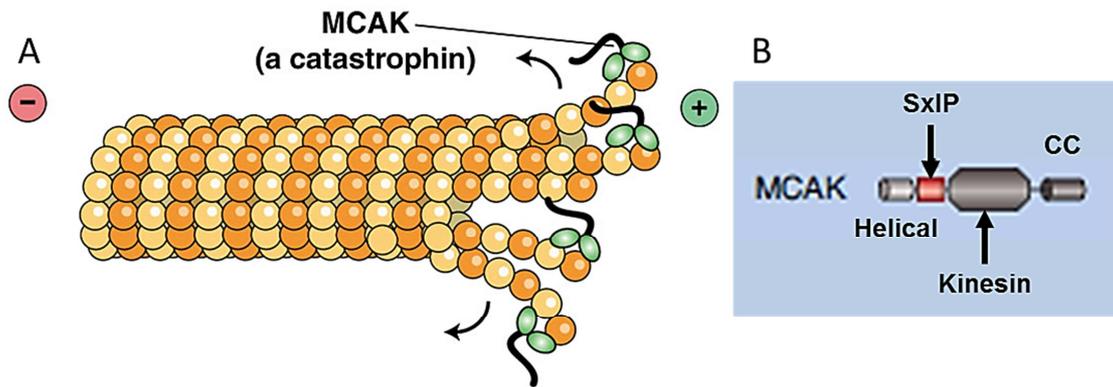


Figure 82 : Structure et activité de MCAK. (A) Localisation de MCAK au niveau des extrémités (+) du microtubule et induction de la dépolymérisation (d'après **Hardin et al., 2012**). (B) MCAK est une kinésine-13 non-motrice, possédant un domaine *Helical*, un motif SxIP permettant sa liaison à EB1, un domaine kinésine et un domaine *coiled coil* (CC) nécessaire pour la dimérisation (d'après **Akhmanova and Steinmetz, 2010**).

Les membres de la famille de la kinésine-8 favorisent aussi la dépolymérisation des MTs (**van der Vaart et al., 2009**). Notamment, KIF18A et Kip3 de levure désassemblent les MTs au niveau de l'extrémité (+), de manière dépendante de la longueur (**Gupta et al., 2006** ; **Mayr et al., 2007**). C'est-à-dire, qu'elles dépolymérisent plus efficacement les microtubules longs que les courts (**Varga et al., 2006**). Cela s'explique du fait que les membres de cette famille ont une activité motrice lente, leur permettant de se déplacer vers les extrémités (+) (**Gardner et al., 2011**). Par conséquent, ces kinésines vont pouvoir enlever les sous-unités de tubuline au niveau des extrémités (+), où elles ont tendance à s'accumuler. Cela a pour conséquence de déstabiliser la coiffe de tubuline-GTP à l'extrémité (+). Par ailleurs, certains membres de la famille de la kinésine-8 peuvent stabiliser les MTs et atténuer leur dynamique (**Varga et al., 2009**). Ces kinésines sont aussi importantes dans la régulation du mouvement des kinétochores, notamment pour l'alignement des chromosomes au centre du fuseau mitotique (**Varga et al., 2006** ; **Mayr et al., 2007** ; **Häfner et al., 2014**). En effet, la perte de l'activité des kinésines de la famille de la kinésine-8 est à l'origine de MTs ayant des longueurs aberrantes dans le fuseau mitotique, et de MTs très stables dans différents organismes (**Gupta et al., 2006** ; **Gandhi et al., 2004** ; **Mayr et al., 2007**).

Chez la levure bourgeonnante, la kinésine motrice Kar-3 (*Karyogamy protein 3*), homologue de la kinésine-14, forme un hétérodimère avec le polypeptide non moteur Cik1. Ce complexe est à l'origine d'une dépolymérisation lente au niveau de l'extrémité (+) des MTs. Afin de dépolymériser les MTs, ce complexe utilise la force motrice de Kar-3 dirigée vers l'extrémité (-) (**Sproul et al., 2005**). L'homologue humain de la kinésine-14, HSET (*Human Spleen, Embryonic tissue and Testes*) et l'homologue du Xénope, XCTK2 (*Xenopus C-terminal Kinesin 2*), contrôlent la longueur du fuseau mitotique (**Cai et al., 2009** ; **van der Vaart et al., 2009**).

Les membres de la famille des kinésines-4 inhibent la croissance des MTs et suppriment les catastrophes, en diminuant le « *turn-over* » global de la tubuline au bout des MTs (**Bieling et al., 2010**). Par exemple, KIF21A, inhibe la croissance microtubulaire au niveau du cortex cellulaire et *in vitro*, inhibe les catastrophes. Ce processus est important pour l'organisation des MTs dans le fuseau mitotique et au cortex cellulaire (**van der Vaart et al., 2013**). Les kinésines motrices de cette famille, montrent typiquement une mobilité dirigée

vers l'extrémité (+). En revanche, KIF7 (*Kinesin-like 7*), un régulateur ciliaire non mobile, régule aussi la longueur des microtubules axonaux (He *et al.*, 2014). Les auteurs ont montré qu'*in vitro* KIF7 réduit la vitesse de croissance des MTs, mais contrairement aux autres membres de la famille, il augmente la fréquence de catastrophe.

B2b – Implication des kinésines dans la division cellulaire

Chez les eucaryotes, pendant la division cellulaire, les moteurs moléculaires sont des régulateurs cruciaux de l'organisation des MTs, l'assemblage du fuseau mitotique, la ségrégation des chromosomes et le transport intracellulaire (She and Yang, 2017). Parmi ces régulateurs on retrouve des membres des familles de kinésine-4, -5, -6, -7, -12 et -14 (cf. Tableau 6 et Figure 83).

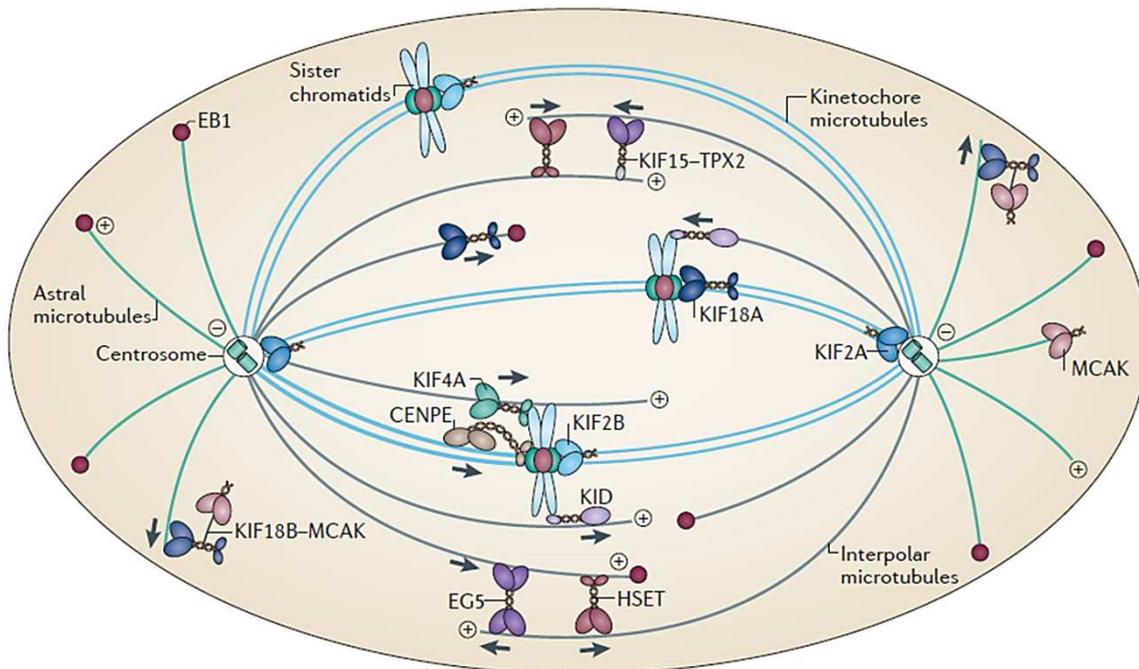


Figure 83 : Modèle simplifié des rôles de différentes kinésines mitotiques pendant la mitose. Pour les kinésines multifonctionnelles, comme les membres des familles de kinésine-14 et -13, seulement une fonction est montrée. Les kinésines interagissent avec pleins d'autres protéines, telles que des kinases mitotiques, des MAPs (EB1) et d'autres protéines non-motrices mitotiques, régulant spatialement et temporellement leurs fonctions (Rath and Kozielski, 2012).

La kinésine-12 (KIF15) est une protéine motrice tétramérique qui joue un rôle primordial dans l'assemblage et la maintenance du fuseau mitotique (cf. Figure 83). Ces fonctions sont redondantes avec la kinésine mitotique Eg5, de la famille de la kinésine-5, qui lie les MTs et conduit l'extension des MTs antiparallèles lors de la formation du fuseau mitotique (Drechsler and McAinsh, 2016 ; cf. Figures 83 et 84). Similairement à la kinésine-12, le kinésine-5 forme aussi un homotétramère donnant une protéine qui possède quatre domaines moteurs (Valentine *et al.*, 2006 ; Alberts *et al.*, 2011 ; cf. Figure 84-A). Cette kinésine participe à l'organisation du fuseau mitotique lors de la mitose en marchant vers les extrémités (+) des microtubules antiparallèles et les poussant simultanément vers les deux pôles mitotiques (Valentine *et al.*, 2006 ; cf. Figure 84-B, C). Par ailleurs, pendant la mitose, Eg5 coopère avec la kinésine tétramérique KIFC1/HSET, de la famille de la kinésine-

14, en participant à l'assemblage du fuseau mitotique et la séparation des centrosomes, ainsi que la ségrégation des chromosomes. Ces deux kinésines sont également impliquées dans la nucléation des MTs mitotiques (She and Yang, 2017 ; cf. Figure 84-C).

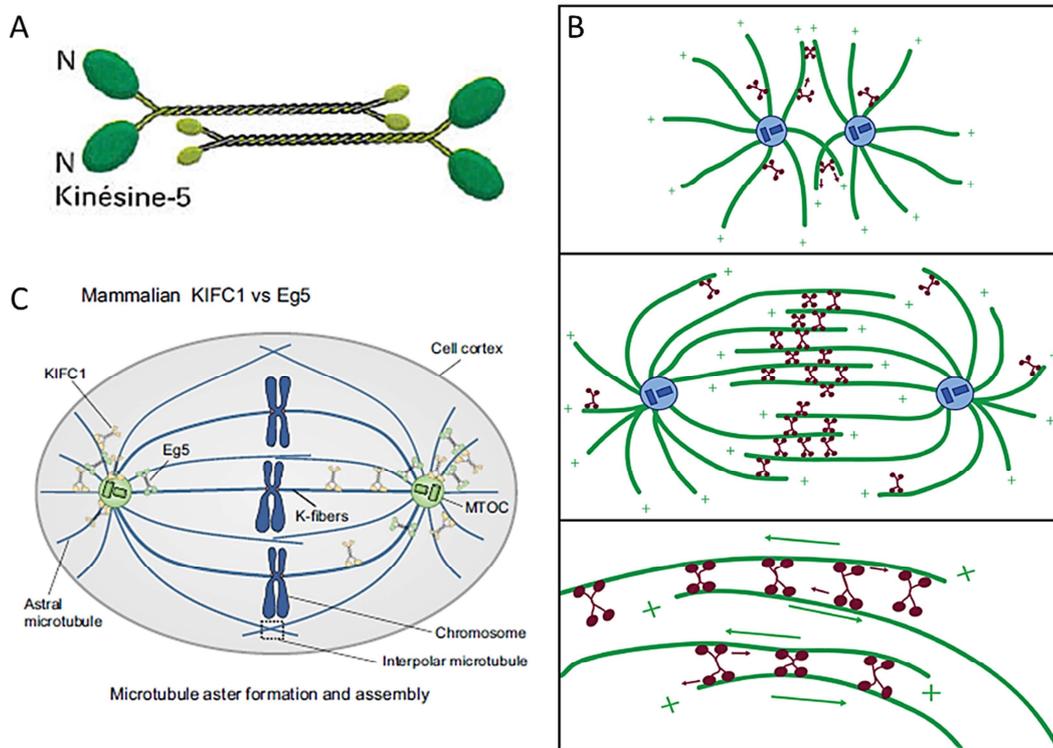


Figure 84 : Structure et rôle dans la division cellulaire des kinésine Eg5 et KIFC1. (A) Structure du tétramère d'Eg5 (en vert) de la famille de la kinésine-5 possédant quatre domaine moteur N-terminaux (en vert foncé) et quatre queues C-terminales (en vert clair) (d'après Alberts *et al.*, 2011). (B) Activité d'Eg5 (en rouge) au niveau des microtubules (en vert) du fuseau mitotique (Valentine *et al.*, 2006). (C) Chez les mammifères, KIFC1 (kinésine-14, en jaune) et Eg5 (kinésine-5, en vert) régulent de manière coopérative la formation des microtubules mitotiques, l'assemblage du fuseau mitotique et la séparation des centrosomes (d'après She and Yang, 2017).

De même, la kinésine CENP-E (*Centromere-associated Protein E*), de la famille de la kinésine-7 est également impliquée pendant la mitose, en étant recrutée sur les kinétochores et permettant leur attachement aux MTs (Sardar *et al.*, 2010 ; cf. Figure 85).

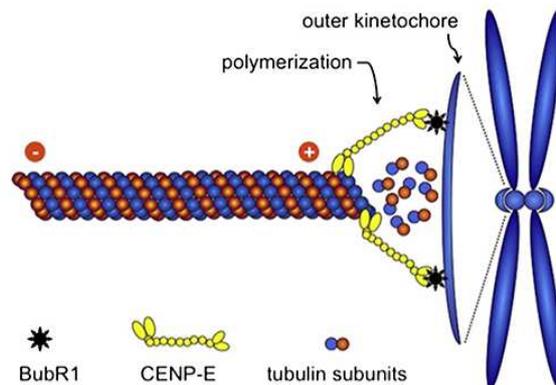


Figure 85 : Rôle de la kinésine CENP-E (kinésine-7) lors de la division cellulaire. La kinésine CENP-E (en jaune) est recrutée sur les kinétochores (en bleu) par BubR1 (en noir) où elle assure la capture des MTs (d'après Sardar *et al.*, 2010).

B3 – Régulation de l'activité de la kinésine-1

Dans les cellules, toutes les molécules de kinésine-1 ne s'accumulent pas aux extrémités (+) des MTs. Cela démontre que l'activité motrice des moteurs moléculaires, n'est pas permanente, permettant ainsi de ne pas consommer de l'ATP inutilement en absence de cargaison.

L'activité de la kinésine-1 peut être régulée de différentes manières, soit directement au niveau de l'activité enzymatique du domaine moteur, soit au niveau de la liaison aux MTs, ou soit dans le chargement des cargaisons aux chaînes légères. Dans le but de réguler l'activité de la kinésine-1, plusieurs hypothèses de mécanisme moléculaire ont été avancées, faisant intervenir notamment, la phosphorylation (cf. **pages 134 et 204**), des changements conformationnels, et l'interaction avec d'autres protéines (**Hollenbeck, 1993 ; Coy et al., 1999 ; Verhley et al., 2001 ; Morfini et al., 2002 ; Reed et al., 2006 ; Adio et al., 2006**).

Concernant les changements conformationnels de la kinésine-1, il a été montré que cette dernière peut adopter une conformation inactive repliée, conduisant à son auto-inhibition, c'est-à-dire empêchant sa liaison aux MTs. La kinésine-1 adopte cette conformation fermée quand il n'y a pas de cargaisons à transporter. Le repliement de la kinésine-1, sur elle-même, résulte en l'interaction entre les queues C-terminales et les têtes motrices N-terminales dans les chaînes lourdes, ainsi que l'interaction entre les chaînes légères et les chaînes lourdes. Dans cette conformation, les deux domaines moteurs sont éloignés, tandis que dans la conformation dépliée active, la tête et la queue de la kinésine-1 s'éloignent et les domaines moteurs se rapprochent pour pouvoir marcher sur les MTs (**Coy et al., 1999 ; Stock et al., 1999 ; Imanishi et al., 2006 ; Adio et al., 2006 ; Cai et al., 2007 ; Hirokawa and Noda, 2008 ; cf. Figure 86**). Dans la conformation dépliée, les chaînes légères (KLCs) ne sont pas toujours liées au complexe (**Maday et al., 2014**).

De plus, il a été démontré que les modifications post-traductionnelles de la tubuline (cf. **page 37**) ont aussi un impact sur la liaison de la kinésine-1 avec les MTs. Par exemple, la dé-tyrosination et l'hyper-acétylation des MTs augmentent le recrutement du moteur (**Lin et al., 2002 ; Reed et al., 2006**). Il est intéressant de noter que, la liaison de la kinésine-1 aux MTs est coopérative. Cela signifie que la fixation d'un moteur moléculaire le long du MT favorise la liaison d'autres moteurs (**Muto et al., 2005**).

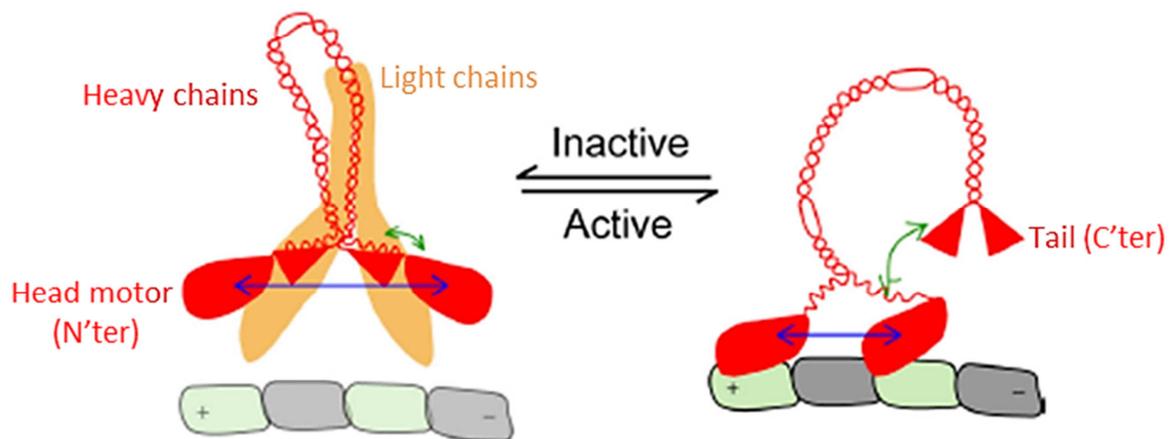


Figure 86 : Changements conformationnels de la kinésine-1. Elle existe dans une forme repliée inactive (à gauche), dans laquelle les domaines globulaires moteurs (en rouge) et les queues C-terminales (en rouge) des chaînes lourdes interagissent, ainsi que les chaînes légères (en orange) et les chaînes lourdes (en rouge). Cette conformation conduit à l'éloignement des moteurs moléculaires (flèche bleue). La kinésine-1 existe aussi sous forme dépliée active (à droite), dans laquelle les têtes motrices et les queues C-terminales des chaînes lourdes n'interagissent plus, conduisant au rapprochement des domaines moteurs (flèche bleue). Dans cette conformation, les chaînes légères ne sont pas toujours liées au complexe. Le microtubule est représenté par une succession de carrés vert (pour la β -tubuline) et gris (pour l' α -tubuline) (d'après **Cai et al., 2007**).

B4 – Interactions des kinésines avec leurs cargaisons

Dans les cellules, la kinésine-1 transporte environ une quarantaine de cargaisons. Afin de mener à bien ses fonctions cellulaires elle s'associe à des protéines d'échafaudages, telles que les protéines JIPs (*JNK-Interacting Proteins*), Milton/TRAKs (*Trafficking Kinesin binding proteins*), GRIP1, syntaxines ou Huntingtin (cf. **Tableau 7**). L'interaction des kinésines avec ces protéines adaptatrices présentent deux intérêts : 1) permettre de relier des cargaisons aux chaînes légères ou indirectement aux chaînes de la kinésine, 2) peut intervenir dans la régulation de l'activité motrice de la kinésine. Ainsi, ces protéines d'échafaudages en interagissant avec la kinésine-1 peuvent coordonner l'activité motrice du moteur moléculaire et soutenir le transport unidirectionnel (**Fu and Holzbaur, 2014**). Par exemple, les JIPs permettent de lier les cargaisons en plus des chaînes légères, et de réguler l'activité motrice (**Verhey et al., 2001 ; Hirokawa and Noda, 2008**). Les protéines Milton et Miro servent d'adaptateurs pour le transport des mitochondries (cf. **Tableau 7**). Le calcium inhibe ce transport. En effet, en présence de calcium, la protéine mitochondriale Miro interagit avec le domaine moteur de la kinésine, empêchant sa liaison aux MTs (**Barlan and Gelfand, 2017**).

Par ailleurs, le transport des protéines d'échafaudages dans les cellules est modulé par des régulateurs s'associant avec ces dernières, tels que des kinases, des GTPases (cf. **Tableau 7**). L'intégration de ces régulateurs et protéines d'échafaudages avec l'activité motrice de la kinésine-1 lui permet d'avoir une spécificité dans le transport et le ciblage des vésicules, organites en réponse à l'environnement cellulaire (**Fu and Holzbaur, 2014**).

Protéines d'échafaudages s'associant à la kinésine-1	Régulateurs des protéines d'échafaudages	Organites transportés
Milton/TRACK (association à KHC)	Senseur du calcium (Miro) Phosphorylation / dégradation (PINK/Parkin)	Mitochondries
Huntingtin (association à la KHC, KLC via HAP1)	Phosphorylation (Akt)	Endosomes, lysosomes, autophagosomes, vésicules APP- ou BDNF-positives, récepteurs GABA, ARN
La (association à la KHC)	Sumoylation	ARN
JIP3/JIP4 (association à la queue en C-terminal de la KHC et KLC)	GTPase (ARF6)	Endosomes, vésicules apoptotiques
JIP1 (association à la queue en C-terminale de la KHC, ainsi qu'à la KLC)	Phosphorylation (JNK) Dégradation	Vésicules APP-positives, autophagosomes, vésicules synaptiques, mitochondries
GRIP1 (association à la queue en C-terminal de la KHC)		Vésicules GluR2-positives
Syntaxine, SNAP25 (association à la queue en C-terminal de la KHC)		Vésicules syntabuline-positives
Kinectine (association à la queue en C-terminal de la KHC)		Réticulum endoplasmique

Tableau 7 : Regroupement des protéines d'échafaudages de la kinésine-1, avec leurs régulateurs, induisant une spécificité envers leurs cargaisons à transporter (d'après **Hirokawa and Noda, 2008** ; **Fu and Holzbaur, 2014**).

Chez les mammifères, les protéines JIPs existent sous trois isoformes (JIP-1, JIP-2 et JIP-3). Les isoformes JIP-1 et JIP-2 sont ubiquitaires, tandis que l'isoforme JIP-3 est spécifiquement exprimée dans le cerveau. Elles s'associent sous forme d'homodimères ou d'hétérodimères. Ce sont des protéines adaptatrices, intervenant aussi dans la voie de signalisation de la MAP kinase JNK (*c-Jun N-terminal Kinase*), appartenant à la famille des MAPKs (*Mitogen-Activated Protein Kinases*) (cf. **page 173**) (**Davis, 2000** ; **Verhey et al., 2001** ; **Hirokawa and Noda, 2008** ; cf. **Figure 87**). JIP-1 et JIP-3 coopèrent pour lever l'auto-inhibition de la kinésine-1 et ainsi activer le moteur pour le transport antérograde axonal (**Sun et al., 2017**).

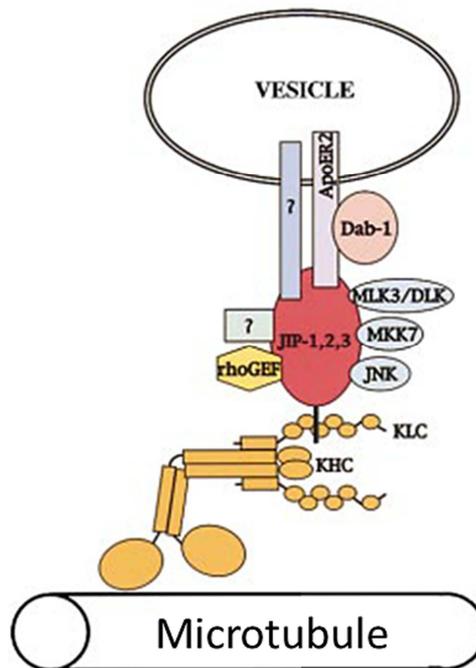


Figure 87 : Transport de cargaisons par la kinésine conventionnelle, aidé des protéines d'échafaudages, JIPs (en rouge). Les protéines JIPs interagissent aussi bien avec des protéines membranaires que cytoplasmiques, telles que les kinases de la voie de signalisation de JNK (d'après **Verhey et al., 2001**).

IV – Régulation de l'activité des MAPs

A – Contrôle des interactions moléculaires des MAPs via les modifications post-traductionnelles de la tubuline

Nous avons vu dans le §ID3 de la première partie (cf. **page 37**) que les isotypes α - et β -tubulines subissent des modifications post-traductionnelles (MPTs). Ces dernières peuvent réguler l'activité de certaines MAPs. Par exemple, la détyrosination de la tubuline régule des moteurs moléculaires cytoplasmiques, telles que la dynéine et la kinésine-1 (**Kreitzer et al., 1999** ; **Dunn et al., 2008** ; **Kaul et al., 2014**), la kinésine-2 (**Sirajuddin et al., 2014**) et la kinésine CENP-E (kinésine-7) (**Barisic et al., 2015**) (**Wehenkel and Janke, 2014** ; **Yu et al., 2015**). De plus, la liaison de la kinésine-1 aux MTs est sensible à la (poly)glutamylolation (**Sirajuddin et al., 2014**). La (poly)glutamylolation influence aussi les affinités de liaison de MAP1A, MAP1B, MAP2 et Tau avec les microtubules (**Boucher et al., 1994** ; **Bonnet et al., 2001**). Une étude plus récente montre que la dépolymérase MCAK (aussi appelée Kif2C), de la famille de la kinésine-13 est plus active sur des MTs dont la tubuline est tyrosinée, plutôt que sur des MTs qui sont détyrosinés (**Peris et al., 2009**). Ceci indique un mécanisme expliquant l'augmentation de la stabilité des MTs détyrosinés dans les cellules. Plusieurs protéines se lient aux extrémités (+) des MTs en croissance contenant des domaines CAP-Gly, tels que CLIP-170 (*Cytoplasmic Linker Protein of 170 kDa*) ou la sous-unité p150^{Glued} de la dynactine, reconnaissent spécifiquement la tyrosine dans la queue C-terminale de l' α -tubuline, permettant un meilleur recrutement de ces protéines aux bouts (+)

des MTs (Peris *et al.*, 2006 ; Bieling *et al.*, 2008 ; Akhmanova and Steinmetz, 2010 ; Nirschl *et al.*, 2016).

B – Régulation de l'activité des MAPs par phosphorylation

Dans les cellules, l'activité des MAPs est régulée par phosphorylation. En effet, plusieurs kinases ont été identifiées pour les MAPs stabilisatrice : MAP1, MAP2, MAP4, Tau, DCX (Ramkumar *et al.*, 2017 ; cf. Tableau 8).

Protéines (MAPs)	Kinases	Effets des phosphorylations
MAP1A/MAP2	MAPK (<i>Mitogen-Activated Protein Kinase</i>) DYRK1a (<i>Dual-specificity tyrosine Regulated Kinase 1a</i>)	Libère les MAPs des vésicules à clathrine Pas d'effet montré sur la dynamique des MTs
MAP1B	GSK3 β (<i>Glycogen Synthase Kinase 3β</i>), DYRK1a	Augmente la capacité de MAP1B à maintenir une population microtubulaire dynamique. Cet effet est contradictoire avec la fonction stabilisatrice connue de MAP1B, indiquant que MAP1B peut avoir différents rôles sur la régulation des MTs en fonction de son état de phosphorylation
MAP1B	JNK1 (<i>c-Jun N-terminal Kinase</i> ; cf. page 204)	Augmente la dynamique, déstabilisation des MTs
MAP1B	Kinases identifiées <i>in vitro</i> : Cdc2, MARK (<i>Microtubule Affinity-Regulating Kinase</i>), casein-kinase II	Pas déterminé
MAP2 (MAP2c)	PKA (<i>cAMP-dependent protein kinase</i>)	Empêche l'interaction de MAP2 avec l'actine
MAP2	MARK, PKC (<i>Protein Kinase C</i>), JNK1 (cf. page 204)	Dissocie MAP2 des MTs
MAP2	Kinases identifiées <i>in vitro</i> : CaMKII (<i>Ca²⁺/calmodulin-dependent protein Kinase</i>), ERK1 (<i>Extracellular signal-Regulated Kinase-1</i>), Cdc2, GSK3 β	Pas déterminé
MAP4	PKC, MAPK, MARK, Cycline-B, Cdc2	Détache MAP4 des MTs Déstabilise les MTs
Tau	GSK3 β , MARK, MAPK, JNK1 (cf. page 204), PKA, ERKs, DYRK1a, casein-kinase I, cdk5 (<i>cyclin-dependent kinase-5</i>)	Diminue l'affinité de Tau pour les MTs Diminue la capacité de Tau à promouvoir la polymérisation des MTs, résultant en une instabilité générale des MTs Affecte interaction entre Tau et EB1
DCX	Cdk5, PKA, MARK, JNK1 (cf. page 204), DCLK1	Diminue l'affinité de DCX pour les MTs Diminue la polymérisation des MTs

Tableau 8 : Exemples de Kinases phosphorylant des MAPs stabilisatrices et effets de ses phosphorylations sur les microtubules (d'après Ramkumar *et al.*, 2017).

La plupart du temps, la phosphorylation conduit à diminuer l'affinité des MAPs pour les MTs (Ramkumar *et al.*, 2017). Dans ce sens, la phosphorylation des MAPs neuronales stabilisatrices (les MAP1/2/4 et Tau) régule leur liaison avec les MTs, au niveau du motif KXGS de chaque domaine répété dans la région MTBR (Sánchez *et al.*, 2000 ; Dehmelt and Halpain, 2005 ; Mohan and John, 2015). Pour MAP2 et Tau, ces motifs sont phosphorylés par plusieurs kinases, comme PKA (*cAMP-dependent Protein Kinase*) (Ozer and Halpain, 2000), et MARK (*Microtubule Affinity-Regulating Kinase*) (Drewes *et al.*, 1995 ; cf. Tableau

8). Tau est également phosphorylée par deux kinases neuronales TTBK1 (*Tubulin Kinase 1* ; **Sato et al., 2006**) et TTBK2 (*Tubulin Kinase 2* ; **Houlden et al., 2007**), induisant l'agrégation de la protéine retrouvée dans de nombreuses pathologies neuronales. La phosphorylation de MAP2 et MAP4 conduit à leur dissociation de la *lattice* des MTs, rendant ainsi les MTs accessibles à des facteurs déstabilisateurs, induisant la catastrophe (**Ebneth et al., 1999** ; **Ozer and Halpain, 2000** ; cf. **Tableau 8**). Tau, MAP2 et MAP4 sont aussi phosphorylées par des protéines kinases (BRSK, MARK et AMPK) appartenant à la voie de signalisation de LKB1 (*Liver Kinase B1*) qui sont impliquées dans la polarité cellulaire (**Lizcano et al., 2004** ; cf. **Tableau 8**). De plus, la voie de la kinase Jun (JNK) (cf. **page 183**) est également impliquée dans la phosphorylation de MAP1, MAP2 (**Chang et al., 2003**), Tau et DCX (**Ramkumar et al., 2017** ; cf. **Tableau 8**).

L'activité des MAPs déstabilisatrices, telles que les stathmines, est également contrôlé par phosphorylation (**Steinmetz, 2007**). En effet, les quatre sérines phosphorylables (Ser16, Ser25, Ser38 et S63) de la stathmine 1 sont phosphorylés par diverses kinases, telles que PI3K, les Cdks, les JNK (cf. **page 204**) qui phosphorylent les Ser25 et Ser38, ainsi que Aurora B, PKA (*Protein Kinase A*), PAK1 (*P21 protein (Cdc42/Rac)-Activated Kinase*) et les CamKs (*Ca₂₊/calmodulin-dependent protein Kinases*) qui phosphorylent la Ser16 et/ou la Ser63 pendant la mitose, conduisant à une inactivation totale de la capacité de liaison de la tubuline des stathmines (**Machado-Neto et al., 2014** ; **Yip et al., 2014**).

Certains moteurs moléculaires sont également phosphorylés (cf. **Tableau 9**). C'est le cas pour la kinésine-1. Ce moteur transporte la kinase JNK, ainsi que ses régulateurs sur de longue distance et peut intervenir dans la localisation cellulaire de cette voie de signalisation (**Verhey et al., 2001** ; **Hirokawa and Noda, 2008**). Du fait de la proximité de JNK, les chaînes lourdes de la kinésine-1, elle-même, peuvent être phosphorylées (**Morfini et al., 2006** ; cf. **page 204**). De plus, JNK, associé à la kinésine peut aussi phosphoryler les protéines d'échafaudages JIP-1 (**Nihalani et al., 2003**) et JIP-3 (**Kelkar et al., 2000** ; cf. **page 196**). Ces phosphorylations régulent l'activation de la kinase (**Kelkar et al., 2000** ; **Nihalani et al., 2003**). Dans ce contexte, il a été montré que la voie des MAPKs pouvait décrocher JIP-1 de la kinésine-1, influençant *in fine* le transport axonal (**Horiuchi et al., 2007** ; **Koushika, 2008**). La phosphorylation de la dépolymérase MCAK (kinésine-13) par Plk1 augmente son activité déstabilisatrice des MTs (**Zhang et al., 2011**).

La phosphorylation des chaînes intermédiaires de la dynéine cytoplasmique par GSK3 β dans les cellules neuronales et non neuronales de mammifères, réduit l'affinité de Ndel1 pour les chaînes intermédiaires (ICs) du moteur moléculaire, engendrant la diminution de la mobilité de la dynéine (**Goa et al., 2015**). Dans le même contexte, une autre étude a montré que l'inhibition de GSK3 β en réponse à une exposition accrue à l'insuline stimule le transport dépendant de la dynéine dirigée vers les extrémités (-) des MTs, en diminuant la liaison d'APC avec la protéine motrice. Cette régulation de l'activité de la dynéine peut moduler les systèmes d'endocytose et de sécrétion des cellules intestinales (**Gao et al., 2017**). Par ailleurs, la phosphorylation de LIS1, régule positivement son interaction avec la dynéine cytoplasmique (**Coquelle et al., 2002**). En revanche, la phosphorylation de p150^{Glued} par la protéine kinase A (PKA), régule négativement l'association de la dynactine avec les MTs,

conduisant à une diminution du transport dépendant du complexe dynéine/dynactine. (Vaughan *et al.*, 2002).

Concernant, les protéines +TIPs, différentes études ont montré que l'association de ces dernières avec les extrémité (+) des MTs entre elles peut être régulée par phosphorylation (Ferreira *et al.*, 2014 ; cf. Tableau 9).

Moteurs moléculaires et leurs protéines associées	Kinases	Références
Kinésine-1	JNK (cf. pages 196 et 204)	Morfini <i>et al.</i> , 2006
KIF18B (Kinésine-8)	Aurora A et B	Tanenbaum <i>et al.</i> , 2011
MCAK (kinésine-13)	Aurora B Cdk1 Plk1	Lan <i>et al.</i> , 2004 ; Andrews <i>et al.</i> , 2004 Sanhaji <i>et al.</i> , 2010 Zhang <i>et al.</i> , 2011
JIP-1, JIP-3	JNK (cf. page 196)	Nihalani <i>et al.</i> , 2003 ; Kelkar <i>et al.</i> , 2000
Dynéine	GSK3 β	Goa <i>et al.</i> , 2015 Gao <i>et al.</i> , 2017
p150 ^{Glued} /dynactine	PKA	Vaughan <i>et al.</i> , 2002
LIS1		Coquelle <i>et al.</i> , 2002
Protéines +TIPs	Kinases	Références
EBs	Aurora A et B	Ban <i>et al.</i> , 2009 ; Ferreira <i>et al.</i> , 2013
	Src-PLC γ 2	Komarova <i>et al.</i> , 2012
	Akt, GSK3 β	Le Grand <i>et al.</i> , 2014
EB1/Bim1	ASK1	Luo <i>et al.</i> , 2016 ; Ran <i>et al.</i> , 2017
	Aurora B/Ipl1	Zimniak <i>et al.</i> , 2009
APC	GSK3 β	Zumbrunn <i>et al.</i> , 2001
	CK1 ϵ	Rubinfeld <i>et al.</i> , 2001
	MAPK/ERK	Caro-Gonzalez <i>et al.</i> , 2012
CLASPs	GSK3 β	Akhmanova <i>et al.</i> , 2001 ; Wittmann and Waterman-Storer, 2005 ; Watanabe <i>et al.</i> , 2009 ; Kumar <i>et al.</i> , 2009 ; Kumar <i>et al.</i> , 2012
	Cdk1	Kumar <i>et al.</i> , 2012 ; Maia <i>et al.</i> , 2012
	Plk1	Kumar <i>et al.</i> , 2012 ; Maia <i>et al.</i> , 2012
CLIP-170 (cf. page 138)	mTOR (FRAP)	Choi <i>et al.</i> , 2002 ; Swietch <i>et al.</i> , 2011 ; Hsu <i>et al.</i> , 2011
	Cdk1/Cdc2	Yang <i>et al.</i> , 2009 ; Amin <i>et al.</i> , 2014
	Plk1	Li <i>et al.</i> , 2010 ; Kakeno <i>et al.</i> , 2014
	CK2	Li <i>et al.</i> , 2010
	AMPK	Nakano <i>et al.</i> , 2010
	PRK/PKN1/3	Collazos <i>et al.</i> , 2011
	PKA	Lee <i>et al.</i> , 2010 ; Nirsch <i>et al.</i> , 2016
LRRK1	Kedashiro <i>et al.</i> , 2015	
MACF1 (ACF7)	GSK3 β	Wu <i>et al.</i> , 2011

Tableau 9 : Exemples de kinases phosphorylant des moteurs moléculaires et leurs protéines associées, ainsi que des +TIPs (d'après Tamura and Draviam, 2012).

Pour les protéines EBs, il a été montré que leur phosphorylation régule l'instabilité dynamique des MTs. Par exemple, dans les cellules HeLa, la phosphorylation d'EB3 sur la sérine 176 par kinases Aurora A et B pendant la mitose (Ban *et al.*, 2009), mène à une augmentation significative de la croissance microtubulaire, permettant la formation du fuseau mitotique (Ferreira *et al.*, 2013). Chez la levure bourgeonnante, Bim1/EB1 est phosphorylée par Aurora B/Ipl1. Cette phosphorylation induit le détachement de Bim1/EB1 des MTs stables et dynamiques *in vitro*, alors qu'*in vivo*, pendant l'anaphase, elle est nécessaire à l'élongation

du fuseau mitotique (Zimniak *et al.*, 2009). Dans les cellules HeLa, la phosphorylation d'EB1 sur la Ser40 et les Thr154 et 206 par ASK1 (*Apoptosis Signal-regulating Kinase 1*) augmente sa fixation aux MTs astraux, induisant leur stabilisation (Luo *et al.*, 2016). Dans les cellules HeLa, d'autres sites de phosphorylation ont été identifiés, telles que Ser27, Thr33 et Tyr71 dans le domaine CH, mais aussi Thr154, Ser155, Ser156, Ser157, Ser165 et Thr166 dans le *linker*, ainsi que Thr206 et Tyr217 dans le domaine EBH. Ces phosphorylations modulent la dynamique des MTs sans affecter l'interaction d'EB1 avec les MTs. En revanche, la phosphorylation de la Tyr217 régule négativement son interaction avec d'autres +TIPs, ainsi que sa dimérisation (Chen *et al.*, 2014a). De même, la phosphorylation de la Ser155 et la Thr166 par Akt/GSK3 β affecte l'accumulation d'EB1 aux extrémités (+) des MTs, ainsi que la dynamique microtubulaire (Le Grand *et al.*, 2014). La phosphorylation d'EB3 sur la sérine 162 par la voie de signalisation de Src-PLC γ 2, activé par la cadhérine assurant l'adhérence des cellules endothéliales, bloque la croissance microtubulaire, entraînant la stabilisation des jonctions adhérentes dans les cellules en interphase (Komarova *et al.*, 2012). La +TIP APC est phosphorylée par GSK3 β , résultant en la réduction de son affinité pour les MTs (Zumbrunn *et al.*, 2001 ; Etienne-Manneville and Hall, 2003 ; cf. Figure 88). Quant aux CLASPs, leur association avec les MTs est également contrôlée par phosphorylation. En effet, dans une première étude, il a été démontré que l'association des CLASPs avec les MTs est négativement régulée par GSK3 β (*Glycogen Synthase Kinase 3 β*) et que GSK3 β affecte l'association entre CLASP2 et EB1 (Akhmanova *et al.*, 2001 ; Wittmann and Waterman-Storer, 2005 ; Watanabe *et al.*, 2009 ; Kumar *et al.*, 2012 ; cf. Figure 88). De même, la régulation de la localisation des CLASPs dans des structures spécifiques pendant la mitose semble être contrôlée via l'activité kinase de Cdk1 et Plk1 (Kumar *et al.*, 2012 ; Maia *et al.*, 2012). La phosphorylation de LIS1 contrôle positivement son interaction avec CLIP-170 et la tubuline, ainsi que la dynamique des MTs (Coquelle *et al.*, 2002).

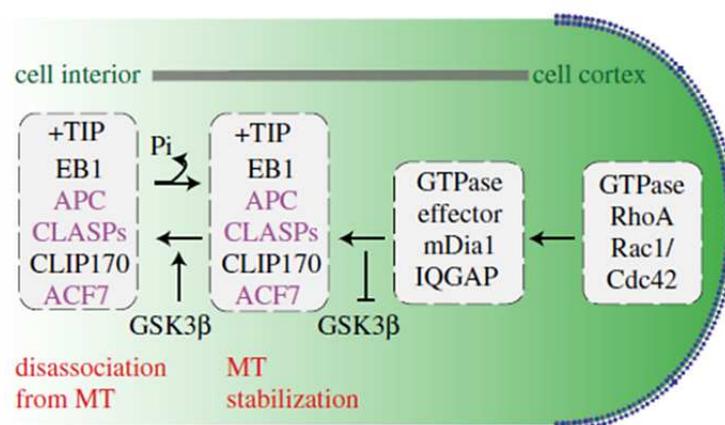


Figure 88 : Phosphorylation de +TIPs par GSK3 β . Dans les cellules en interphase, les +TIPs indiquées stabilisent les microtubules au niveau du cortex. Les substrats de GSK3 β (en violet) se dissocient des microtubules lorsqu'ils sont phosphorylés (Tamura and Draviam, 2012).

Le facteur de sauvetage, CLIP-170 est phosphorylé par diverses kinases (cf. Tableau 9). Durant ce travail, nous nous sommes particulièrement intéressés à la phosphorylation de CLIP-170, qui est donc détaillé un peu plus loin dans ce manuscrit (cf. page 146). Parmi les kinases, nous pouvons citer l'AMPK, qui affecte la stabilité des MTs et la polarité (Nakano *et*

al., 2010). L'AMPK a également été montrée comme étant nécessaire à l'établissement de la croissance des neurites et leur différenciation en axones (**Amato et al.**, 2011).

V – La famille des CLIPs et son membre fondateur CLIP-170

Les protéines de lien cytoplasmique CLIPs (*Cytoplasmic Linker Proteins*), ont été décrites comme pouvant relier des cargaisons ou organites cellulaires avec les MTs (**Scheel and Kreis, 1991** ; **Pierre et al.**, 1992). Le premier membre identifié de cette famille a été CLIP-170 (*Cytoplasmic Linker Proteins of 170 kDa*), aussi appelée CLIP1, originellement été identifiée dans les cellules HeLa, comme étant une protéine de 170 kDa qui lie les MTs (**Rickard and Kreis, 1990**), et des analyses biochimiques ont montré que sa liaison aux MTs est régulée *in vitro* par phosphorylation (**Richard and Kreis, 1991**). C'est un facteur de sauvetage (**Komarova et al.**, 2002a) capable de lier spécifiquement les extrémités (+) des MTs en croissance (**Diamantopoulos et al.**, 1999 ; **Perez et al.**, 1999) et est donc une +TIP (cf. page 87).

Chez les mammifères, le KO de CLIP-170 engendre une stérilité et des pathologies neuronales. En effet, des souris déplétées en CLIP-170 sont viables, mais les souris mâles produisent des spermatozoïdes anormaux, pour lesquels la morphologie de la tête est perturbée (**Akhmanova et al.**, 2005). Chez l'homme, l'absence du transcrit de *CLIP1* est viable, mais peut causer un déficit cognitif et un défaut de spermatogénèse. De part ces résultats, les auteurs ont proposé le gène *CLIP1* comme un nouveau gène pour l'ARID (*Autosomal Recessive Intellectual Disability*) (**Larti et al.**, 2015).

A – Les membres de la famille des CLIPs

CLIP-170, considérée comme le prototype de la famille des CLIPs (**Perez et al.**, 1999), est codée par le gène *CLIP1* (*Cytoplasmic Linker Protein 1*), aussi appelé *CYLN1* et *RSN*. Chez les mammifères, quatre isoformes de CLIP-170 sont exprimés (**Griparic and Keller, 1998**), provenant d'épissage alternatif, mais seulement trois isoformes sont retrouvées dans les banques (cf. **Annexe II**). Parmi ces isoformes il y a la restine (*Reed-Sternberg Intermediate filament-associated protein*) (**Bilbe et al.**, 1992 ; cf. **Figures 89 et 90**). Cette isoforme a initialement été clonée dans des monocytes humains en culture (**Bilbe et al.**, 1992), puis chez le poulet (35-restin), montrant une forte homologie avec l'isoforme humaine (**Griparic et al.**, 1998 ; cf. **Figure 89-A**). Néanmoins, un « gap » de six acides aminés dans le domaine *coiled-coil* différencie ces deux protéines homologues (**Griparic and Keller, 1999** ; cf. **Figure 89-B**). Chez l'homme, l'isoforme restine diffère de CLIP-170 du fait de l'insertion de trente-cinq acides aminés dans la partie centrale de la protéine, soit le domaine *coiled-coil* (**Griparic and Keller, 1998** ; cf. **Figure 90**).

L'expression de CLIP-170/restine est augmentée dans les cellules de Reed-Sternberg (RS) dans le lymphome de Hodgkin et dans le lymphome anaplasique à grandes cellules (**Delabie et al.**, 1992 ; **Bilbe et al.**, 1992 ; **Delabie et al.**, 1993). Alors que l'expression CLIP-170/restine est faible dans les monocytes, elle est forte dans les cellules qui en dérivent, telles

que les cellules dendritiques (DCs) et les cellules B activées, qui sont impliquées dans la présentation des antigènes (**Sahin et al., 2002**).

A	
GDLE RRQISEDPENTQTKLEHARIKELEQSLLFEKTKADKLQRELEDTRVATV	CLIP-170 (11+35) Ubiquitaire
454 GDLE TQTKLEHARIKELEQSLLFEKTKADKLQRELEDTRVATV 496	CLIP-170 (35-Restin) Cerveau
GDLE RRQISEDPEN VATV	CLIP-170 (11) Muscle squelettique
GDLE VATV	CLIP-170 Ubiquitaire
B	
794 IQNLETEK-----VSNL 805	CLIP-170 (35-Restin) Chicken
IQNLETEK VGGSSK VSNL	CLIP-170 (11) Chicken
: : : : : : : :	
793 IKHLEIEK NAESSK ASSI 810	CLIP-170 (35-Restin) Human

Figure 89 : Isoformes de CLIP-170. **(A)** Alignement des séquences peptidiques des isoformes de CLIP-170 de poulet, ainsi que leur expression tissulaire majeure chez l'adulte. Les quatre isoformes proviennent de l'épissage alternatif de deux exons, de 11 et 35 acides aminés respectivement, qui sont indiqués en gras. Chez l'homme, l'isoforme CLIP-170 (11) n'est pas retrouvée dans les banques de données et est peu fréquente (d'après **Griparic and Keller, 1998**). **(B)** Comparaison des séquences peptidiques dans le domaine *coiled-coil* de CLIP-170 (35-Restin) et CLIP-170(11) chez le poulet, ainsi que CLIP-170 (35-Restin) chez l'homme. L'alignement montre que l'isoforme CLIP-170 (35-Restin) de poulet différencie de celle de l'homme par une insertion de six acides aminés dans le domaine *coiled-coil*. L'isoforme CLIP-170 (11) de poulet contient également cette insertion (d'après **Griparic et al., 1998**).

Chez l'homme, trois autres gènes (*CLIP2/CYLN2*, *CLIP3/RSNL1* et *CLIP4/RSNL2*) codent pour des protéines appartenant aussi à cette famille. Le gène *CLIP2* (*Cytoplasmic Linker Protein 2*) code pour CLIP-115 (*Cytoplasmic Linker Proteins of 115 kDa*) qui est considérée comme le paralogue le plus proche de CLIP-170 (**Hoogenraad et al., 2000** ; cf. **Figure 90**), alors que le gène *CLIP3* (*Cytoplasmic Linker Protein 3*) code pour CLIP-59, une protéine golgienne qui possède également deux domaines CAP-Gly (**Perez et al., 2002**).

CLIP-170 est conservée au cours de l'évolution (cf. **Figure 90**). Des homologues sont retrouvés chez la drosophile (*D. melanogaster*), D-CLIP-190 (*Drosophila CLIP of 190 kDa*) (**Lantz and Miller, 1998**), la poisson zèbre Clip1a et Clip1b (**Weng et al., 2013**), le champignon (*A. Nidulans*), CLIPA (**Efimov et al., 2006**), la levure bourgeonnante (*S. cerevisiae*), Bik1 (*Bilateral karyogamy defect*) (**Berlin et al., 1990**), ainsi que la levure fissipare (*S. pombe*), Tip1 (*Tea inducing protein 1*) (**Brunner and Nurse, 2000** ; cf. **Figure 90**), mais aussi chez les plantes (*A. thaliana*), At1g20970.1, At1g65010.1, At4g27595.1, At4g36520 (**Gardiner et al., 2011**).

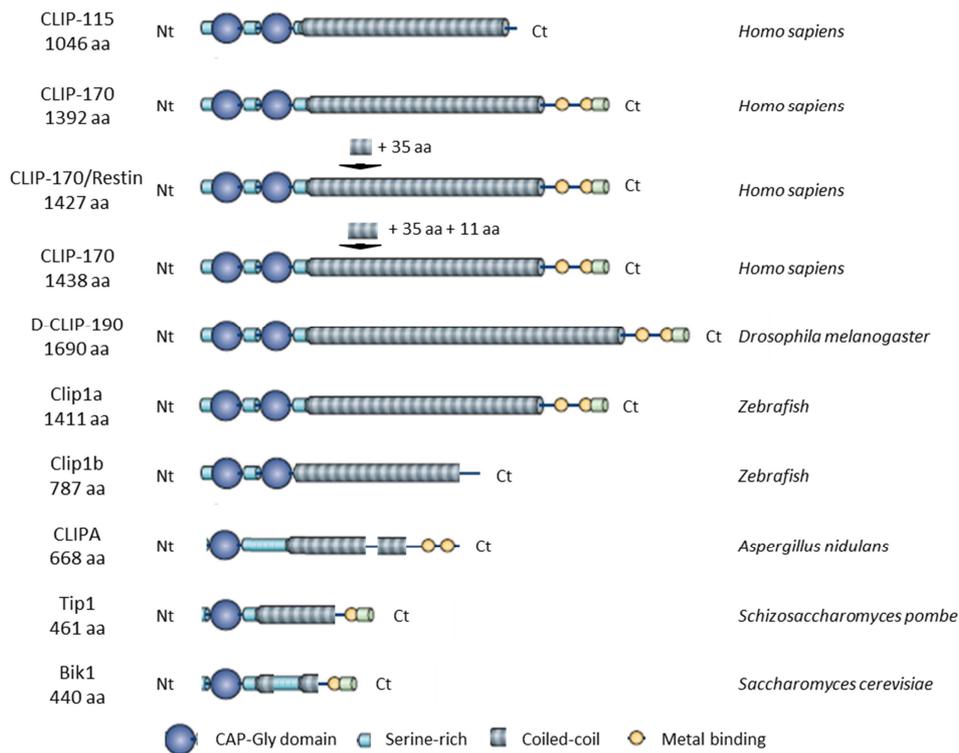


Figure 90: Structure des isoformes et homologues de CLIP-170 dans différentes espèces ainsi que la structure de son paralogue humain, CLIP-115 (aa : acides aminés ; Ct : C-terminal ; Nt : N-terminal) (d’après **Griparic and Keller, 1998** ; **Lantz and Miller, 1998** ; **Brunner and Nurse, 2000** ; **Efimov et al., 2006** ; **Akhmanova and Steinmetz, 2008** ; **Weng et al., 2013**).

B – Structure de CLIP-170

CLIP-170 est une molécule polaire très allongée qui présente trois domaines (**Scheel et al., 1999**).

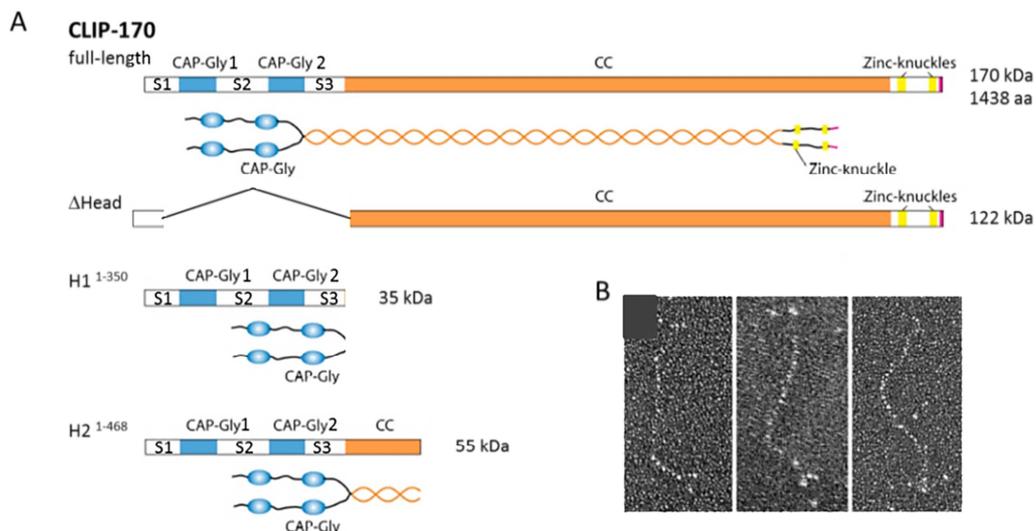


Figure 91 : Structure de CLIP-170. (A) Organisation des domaines fonctionnels dans un homodimère de CLIP-170, ainsi que les constructions Δ Head, H1 et H2. Dans sa partie N-terminale, CLIP-170 possède deux domaines CAP-Gly (en bleu) et trois régions riches en sérines (en blanc), au centre un domaine *coiled-coil* (en orange), et en C-terminal deux motifs doigt de zinc (en jaune) et un motif ETF (en rouge) (d’après **Pierre et al., 1994** ; **Bieling et al., 2008** ; **Gupta et al., 2010**). (B) Observation au microscope électronique d’un homodimère parallèle de CLIP-170 (d’après **Scheel et al., 1999**).

Tout d'abord, dans la partie N-terminale, aussi appelée domaine H1 (1-350 aa), CLIP-170 possède deux domaines CAP-Gly (*Cytoskeleton Associated Protein Glycine-rich*) qui sont entourés par trois régions basiques, riches en sérines (cf. **Figure 91-A**) qui sont suffisants pour l'ancrage de CLIP-170 aux MTs (**Pierre et al., 1992 ; Pierre et al., 1994**). En effet, un grand nombre d'études ont montré que les domaines CAP-Gly de CLIP-170 interagissent avec la tubuline, les protéines EBs et SLAIN2. La partie N-terminale de la protéine interagit également avec IQGAP1 et des kinases (Plk1, Cdk1, AMPK, PKA, PRK/PKN1/3) (cf. **Figure 92 et Annexe I**). IQGAP1 est un effecteur des membres de la famille des petites protéines GTPases Rho, Rac1 et Cdc42 (**Hart et al., 1996 ; Kuroda et al., 1996**), et une protéine se liant aux filaments d'actine (**Bashour et al., 1997 ; Fukata et al., 1997**). En interagissant directement avec la partie N-terminale de CLIP-170, elle active Rac1 et Cdc42 qui s'associent au complexe IQGAP1/CLIP-170 (**Fukata et al., 2002 ; cf. Figure 92**). L'interaction entre IQGAP1 et CLIP-170 est positivement régulée par la kinase mTOR (**Swiech et al., 2011**). Grâce à son interaction avec IQGAP1, CLIP-170 est impliqué dans la morphogénèse cellulaire (**Fukata et al., 2002 ; Suzuki and Takahashi, 2008 ; Swiech et al., 2011**).

Ensuite, en son centre CLIP-170 présente un long domaine *coiled coil*, qui est constitué d'hélices α enroulées entre elles dû à la présence de sept acides aminés hydrophobes : *heptad* (cf. **Figure 91-A**). Cette partie de la protéine assure son homodimérisation (**Pierre et al., 1992 ; Scheel et al., 1999**) et permet son interaction avec différents partenaires, tels que les CLASPs, mDia1/formins et des kinases (mTOR et CK2) (cf. **Figure 92 et Annexe I**). En purifiant CLIP-170 à partir de cellules HeLa, cette forme homodimérique a pu être observée (**Scheel et al., 1999 ; cf. Figure 91-B**). Cet homodimère parallèle est important pour que CLIP-170 mène à bien ses fonctions (**Pierre et al., 1994 ; Scheel et al., 1999 ; Gupta et al., 2009**). L'interaction entre les CLIPs (CLIP-115 et CLIP-170) et les CLASPs a été trouvée par Akhmanova et son équipe. Du fait de l'homologie des CLIPs, ils ont recherché des partenaires communs à ces deux protéines, via un système double-hybride chez la levure. Ils ont ainsi pu identifier deux protéines de mammifères, CLASP1 et CLASP2. Les CLASPs s'associent aussi bien avec les CLIPs, qu'avec les MTs. par ailleurs, le complexe CLIP-170/CLASP a un effet stabilisateur des MTs, en aidant la croissance microtubulaire (**Akhmanova et al., 2001**). Ces deux protéines ont été montrées comme étant impliquée dans le sauvetage des MTs (**Komarova et al., 2002a ; Mimori-Kiyosue et al., 2005**).

Enfin, dans la partie C-terminale CLIP-170 possède un domaine de liaison au métal, composé de deux motifs doigt de zinc (**Pierre et al., 1992 ; Pierre et al., 1994 ; Scheel et al., 1999 ; cf. Figure 91-A**), permettant des interactions protéiques avec certains de ses partenaires, comme CLIP-115, LIS1, et p150^{Glued}, ainsi qu'une kinase, LRKK1 (cf. **Figure 92 et Annexe I**).

CLIP-170 peut également interagir avec une déacétylase (HDAC6 : *Histone Deacetylase 6*) via ses domaines *coiled-coil* et doigt de zinc (cf. **Figure 92 et Annexe I**).

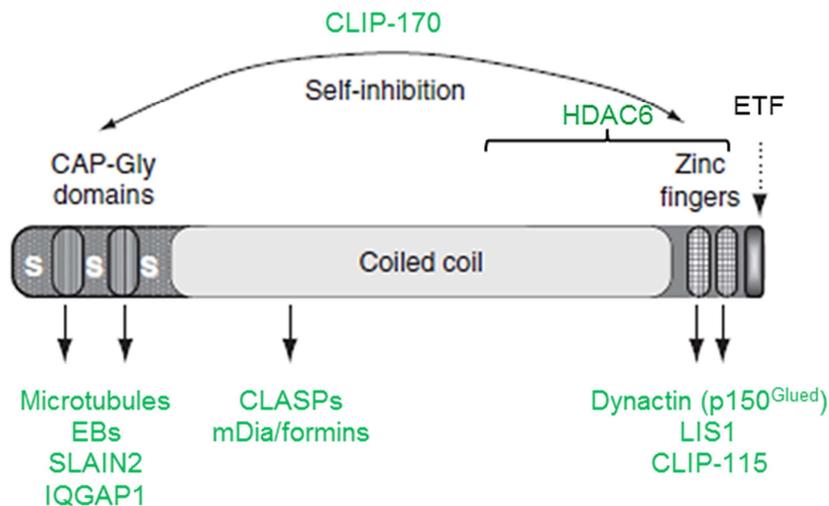


Figure 92 : Interactions protéines médiées par les domaines structuraux de CLIP-170. Sites d'interaction de CLIP-170 avec ses partenaires (en vert) : les microtubules, IQGAP1, HDAC6, mDia/formins et des +TIPs (EBs, CLASPs, SLAIN2, Dynactine (p150^{Glued}), LIS1, CLIP-115 et CLIP-170). L'auto-inhibition de CLIP-170 par repliement moléculaire est aussi montrée (d'après **Gouveia and Akhmanova, 2010**).

B1 – Auto-inhibition de CLIP-170 par repliement moléculaire

Dans les cellules, CLIP-170 existe sous deux formes, l'une dépliée et active, et l'autre repliée et inactive (cf. **Figure 93**). Cette conformation repliée inactive résulte en l'interaction entre les domaines CAP-Gly en N-terminal et les motifs doigt de zinc en C-terminal de la même protéine (**Lansbergen *et al.*, 2004**). Les deux domaines CAP-Gly de CLIP-170 se fixent à ses deux motifs doigt de zinc avec des affinités similaires (**Weisbrich *et al.*, 2007**). Ce repliement intramoléculaire, qui masque les domaines CAP-Gly et doigt de zinc, empêche CLIP-170 d'interagir avec les microtubules et ses autres partenaires protéiques, tels que les +TIPs p150^{Glued}, EB1, LIS1 (**Lansbergen *et al.*, 2004** ; **Galjart, 2005** ; **Hayashi *et al.*, 2007**). Lorsque CLIP-170 s'auto-inhibe, elle utilise les mêmes domaines de liaison, que ceux qu'elle utilise pour interagir avec p150^{Glued}. Cela suggère que la régulation de la liaison aux MTs par les +TIPs arrive via une compétition directe avec les interactions intramoléculaires de CLIP-170 (**Hayashi *et al.*, 2007**).

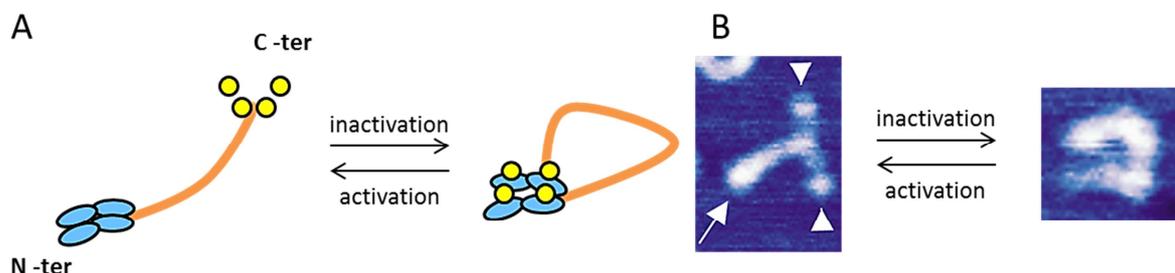


Figure 93 : Repliement intramoléculaire de CLIP-170 conduisant à son inactivation. (A) CLIP-170 sous forme dépliée, a ses domaines CAP-Gly (en bleu) et ses motifs doigt de zinc (en jaune) libres pour assurer leurs fonctions (à gauche). Au contraire, lorsque les parties C-terminales et N-terminales interagissent entre elles, cela engendre la fermeture de la protéine et son inactivation (à droite). (B) Observation en microscopie à force atomique de HIS-CLIP-170 purifiée sous forme ouverte (à gauche) et repliée (à droite). Les domaines globulaires N-terminaux sont indiqués par des têtes de flèches blanches et les domaines C-terminaux sont indiqués par une flèche blanche (d'après **Lansbergen *et al.*, 2004**).

Dans les cellules, cette auto-inhibition de CLIP-170 est régulée par les protéines EBs et la tubuline. Ces dernières peuvent activer CLIP-170 en induisant le dépliement de la protéine du fait de la grande affinité de leurs motifs C-terminaux EEY/F pour le motif très conservé GKNDG dans les domaines CAP-Gly (**Weisbrich et al., 2007**). De même, un petit neurostéroïde, le pregnenolone (P5) induit l'activation de CLIP-170 par changement conformationnel en interagissant avec son domaine *coiled-coil*. Cette activation de CLIP-170 par le P5, augmente son interaction avec les microtubules, la sous-unité p150^{Glued} de la dynactine et LIS1, mais aussi la polymérisation des MTs, ainsi que la migration des cellules du poisson zèbre (**Weng et al., 2013**).

L'auto-inhibition de CLIP-170 est également régulée par la phosphorylation de sérines dans la troisième région riche en sérines (**Lee et al., 2010 ; Nakano et al., 2010 ; Kakeno et al., 2014 ; Nirschl et al., 2016**). Dans les cellules HeLa, la Plk1 (*Polo-like kinase 1*) phosphoryle la Ser312 de CLIP-170 (**Kakeno et al., 2014 ; cf. Figure 94**). Cette sérine est également phosphorylée par PRK (*PKC (Protein Kinase C)-Related Kinase*) / PKN1/3 (*Protein Kinase N 1/3*) (**Collazos et al., 2011**). Chez la souris, l'AMPK (*AMP-activated Protein Kinase*) phosphoryle spécifiquement la Ser311 (**Nakano et al., 2010**), tandis que la PKA (*Protein Kinase A*) phosphoryle préférentiellement les sérines 309, 311, 313, 319 et 320 localisées dans la troisième région riche en sérines (**Lee et al., 2010 ; Nirschl et al., 2016**). Ces différentes phosphorylations sont connues pour inhiber CLIP-170, en induisant le repliement intramoléculaire de la protéine (**Lee et al., 2010 ; cf. Figure 94**), empêchant l'interaction de CLIP-170 avec les MTs (**Lee et al., 2010 ; Nakano et al., 2010 ; Kakeno et al., 2014**), ainsi qu'avec ses partenaires protéiques, comme le complexe dynéine/dynactine (**Lee et al., 2010**). Dans les cellules Vero et HeLa, en entraînant le décrochement de CLIP-170 de la *lattice* des MTs via son repliement intramoléculaire induit par phosphorylation, cela permet de restreindre la localisation de CLIP-170 aux extrémités (+) des MTs (**Nakano et al., 2010 ; Lee et al., 2010**) et d'augmenter la vitesse de polymérisation (**Nakano et al., 2010**).

de régions positivement chargées, riches en sérines. Ces domaines permettent son interaction avec le motifs EEY/F d'EB1 (**Komarova et al., 2005**) et le domaine C-terminal de CLIP-170 (**Lansbergen et al., 2004** ; cf. **Annexe I**). Au centre, CLIP-115 un long motif *coiled-coil*, avec les cystéines 801 et 860 qui forment un pont disulfure, assurant l'homodimérisation de la protéine. Ce motif *coiled-coil* permet à CLIP-115 d'interagir avec les CLASPs (**Akhmanova et al., 2001**), mais aussi le complexe dynéine/dynactine via BicD (*Bicaudal D*) (**Hoogenraad et al., 2001** ; cf. **Annexe I**). En revanche, CLIP-115 ne contient pas de domaine doigt de zinc en C-terminal et ne peut donc pas s'auto-inhiber par repliement moléculaire, ni recruter certains partenaires, tels que LIS1 ou p150^{Glued} (**De Zeeuw et al., 1997** ; **Hoogenraad et al., 2000** ; **Hoogenraad et al., 2002** ; cf. **Figure 90**). Néanmoins, lorsque CLIP-115 est phosphorylée dans sa partie N-terminale (domaine H1), elle se détache des MTs. Cela a été montré *in vitro*, en incubant des extraits cellulaires de cellules CHO transfectées avec GFP-CLIP-115 (domaine H1) avec de l'ATP et un inhibiteur de phosphatases, l'acide okadaïque (**Hoogenraad et al., 2000**).

L'homologue de CLIP-170 chez la drosophile, D-CLIP-190 possède les trois régions structurales conservées (cf. **Figure 90**). Elle présente 34,5% d'identité de séquence et 53% de similitude avec la protéine humaine. La différence entre ces deux protéines provient de la séquence nucléotidique du domaine *coiled-coil*, qui est plus longue chez la protéine de la drosophile (**Lanz and Miller, 1998** ; cf. **Figure 90**). La dimérisation de D-CLIP-190 facilite sa liaison aux extrémités (+) des MTs de la même façon que son homologue humain (**Slep and Vale, 2007**). La drosophile ne présente pas d'anomalie fonctionnelle même si D-CLIP-190 est absent (**Dix et al., 2013** ; **Beaven et al., 2015**).

Les homologues de CLIP-170 chez le poisson zèbre sont codés par les gènes *Clip1a* et *Clip1b*. Le gène *Clip1a* est localisé dans le chromosome 5 et code pour Clip1a, une protéine de 1411 acides aminés ayant une séquence très similaire à CLIP-170 humaine. Le gène *Clip1b* est localisé sur le chromosome 10 et code une plus petite protéine de 787 acides aminés, différant de CLIP-170 humaine dans sa partie C-terminal (**Weng et al., 2013** ; cf. **Figure 90**).

L'homologue de CLIP-170 chez le champignon multicellulaire (*A. nidulans*), CLIPA, une protéine de 668 acides aminés. Elle diffère de CLIP-170 humaine dans sa partie N-terminal car elle ne possède qu'un domaine CAP-Gly et une région riche en sérines plus étendue. Au centre de la protéine, le domaine *coiled-coil* est plus court et séparé en deux par rapport à la séquence de CLIP-170 humaine. En C-terminal, comme CLIP-170 humaine, CLIPA possède deux motifs doigt de zinc (**Efimov et al., 2006** ; cf. **Figure 90**). La délétion du gène *ClipA* (codant pour CLIPA) ne perturbe pas le transport nucléaire, mais affecte les MTs cytoplasmiques (**Efimov et al., 2006**).

Les homologues de CLIP-170, chez la levure sont Tip1 et Bik1. Chez la levure fissipare (*S. pombe*), le gène codant pour Tip1 a été identifiée via un crible visant à isoler les gènes, qui lorsqu'ils sont surexprimés ils provoquent une modification de la morphologie de la levure (**Brunner and Nurse, 2000**). C'est une protéine de 53 kDa et de 461 acides aminés (**Jannatipour and Rokeach, 1998** ; cf. **Figure 90**). Chez la levure bourgeonnante (*S. cerevisiae*), Bik1 a été trouvé comme le produit d'un gène nécessaire pour la fusion nucléaire, faisant 57 à 60 kDa, d'environ 440 acides aminés (**Trueheart et al., 1987** ; cf. **Figure 90**). Un argument supplémentaire attestant du lien entre Bik1 et CLIP-170, provient de l'identification

de la kinase TOR (homologue de mTOR) qui interagit avec Bik1 et la phosphoryle de la même manière que mTOR pour CLIP-170 (**Choi et al., 2000**). Au niveau de la structure, ces deux homologues possèdent trois domaines fonctionnels qui sont identiques à ceux de CLIP-170. Cependant, ils ne possèdent qu'un seul domaine CAP-Gly et un seul motif de liaison au métal dans leur partie N-terminale et C-terminale, respectivement (**Berlin et al., 1990 ; Brunner and Nurse, 2000 ; cf. Figure 90**). Néanmoins, l'unique domaine CAP-Gly de Bik1 a été montré comme étant un équivalent fonctionnel de celui de CLIP-170, permettant notamment la liaison des MTs aux kinétochores (**Lin et al., 2001**), ainsi que le repliement moléculaire de la protéine. Les levures sont viables même si Tip1 ou Bik1 sont mutées (**Berlin et al., 1990 ; Brunner and Nurse, 2000**).

D – Modifications post-traductionnelles de CLIP-170

En plus des phosphorylations décrites précédemment contrôlant le repliement, CLIP-170 subit d'autres modifications post-traductionnelles qui régulent son expression et son activité cellulaire.

CLIP-170 a été caractérisée comme une phosphoprotéine, impliquant de multiples sites *in vivo*, et ayant un rôle majeur dans la régulation de son affinité avec les MTs (**Rickard and Kreis, 1990**). Selon les kinases et les sites ciblés, la phosphorylation de CLIP-170 inhibe ou active son activité. Initialement, il a été montré qu'*in vivo* la phosphorylation de CLIP-170/CLIP-115 inhibe sa liaison avec les MTs (**Rickard and Kreis, 1991 ; Hoogenraad et al., 2000**). Par ailleurs, des études, montrant qu'*in vivo*, le comportement de liaison de CLIP-170 aux MTs est régulé par de multiples kinases et probablement des phosphatases, ont souligné la complexité de la question (**Rickard and Kreis, 1991 ; Choi et al., 2002**).

Comme nous l'avons vu précédemment, la phosphorylation de la Ser312 par PKA (**Lee et al., 2010**), AMPK (**Nakano et al., 2010**), PRK/PKN1/3 (**Collazos et al., 2011**) et Plk1 (**Kakeno et al., 2014**), ainsi que des sérines 310, 312, 314, 320 et 321 humaines principalement par PKA (**Lee et al., 2010 ; Nirschl et al., 2016**), inhibe l'activité de CLIP-170 en induisant la fermeture de la protéine (cf. **Figure 95-A ; cf. page 142**). La phosphorylation de la S312 de CLIP-170 par PRK/PKN1/3 (*PKC (Protein Kinase C)-Related Kinase/Protein Kinase N 1/3*) a été montrée *in vitro* grâce à une analyse en spectrométrie de masse (**Collazos et al., 2011 ; cf. Figure 95-A**).

Au contraire, d'autres études ont mis en évidence que la phosphorylation de CLIP-170 régule positivement l'affinité de CLIP-170 pour les MTs. Dans ce sens, il a été montré qu'*in vivo* la kinase mTOR, aussi appelée RAFT, FRAP (*FKBP12R-Rapamycine-Associated Protein*) phosphoryle CLIP-170, sur un site sensible à la rapamycine (**Choi et al., 2002**). Une analyse protéomique révèle que c'est potentiellement sur la Thr1158 (**Hsu et al., 2011 ; cf. Figure 95-A**). Quand mTOR est inhibée par la rapamycine, CLIP-170 est déphosphorylée et perd sa capacité de liaison des extrémités (+) des MTs (**Choi et al., 2002**). Par conséquent, les chercheurs tendent à penser que l'inhibition de la phosphorylation de CLIP-170 par mTOR, en utilisant la rapamycine pourrait jouer un rôle dans l'inhibition des cancers humains (**Choi et al., 2002**). L'interaction entre CLIP-170 et mTOR est nécessaire pour la formation du complexe protéique CLIP-170/IQGAP1 régulant la morphologie des dendrites (**Swietch et al., 2011**). La fonction de mTOR est conservée. En effet, dans la levure bourgeonnante lorsque TOR (homologue de mTOR) est inhibée (par la rapamycine) cela affecte l'assemblage,

l'élongation et la stabilité des MTs, possiblement via Bik1 (homologue de CLIP-170) qui est directement phosphorylée en interagissant avec la kinase, affectant sa capacité à lier la tubuline et les MTs (Choi *et al.*, 2000).

De plus, *in vivo* la Thr287 de CLIP-170 est phosphorylée par Cdk1/Cdc2 (cf. Figure 95-A). Cette phosphorylation régule positivement la localisation de CLIP-170 aux extrémités (+) des MTs pendant la phase G2 et la transition G2/M, assurant la progression du cycle cellulaire (Yang *et al.*, 2009). Dans les cellules HeLa, la Thr287 de CLIP-170 est également phosphorylée par Cdk1/Cdc2 et cette phosphorylation est activatrice et nécessaire pour recruter Plk1 aux kinétochores (Amin *et al.*, 2014 ; cf. Figure 95-A).

Par ailleurs, dans les cellules HeLa, la phosphorylation de la Ser195 par Plk1 (*Polo-like kinase 1*) facilite l'interaction de CK2 (*Casein Kinase 2*) avec CLIP-170, induisant la phosphorylation de la Ser1318. Ces phosphorylations sont activatrices et nécessaires pour l'attachement des kinétochores aux MTs, de manière dépendante du complexe dynéine/dynactine (Li *et al.*, 2010 ; cf. Figure 95-A).

Enfin, la phosphorylation de la Thr1384, localisée dans le second motif doigt de zinc du C-terminal de CLIP-170, par LRKK1 (*Leucine-Rich Repeat Kinase 1*) facilite l'interaction de CLIP-170 avec les complexes dynéine/dynactine, en permettant l'accumulation de p150^{Glued}/DCTN1 (*Dynactin subunit 1*) au niveau des extrémités (+) des MTs (Kedashiro *et al.*, 2015 ; f. Figure 95-A).

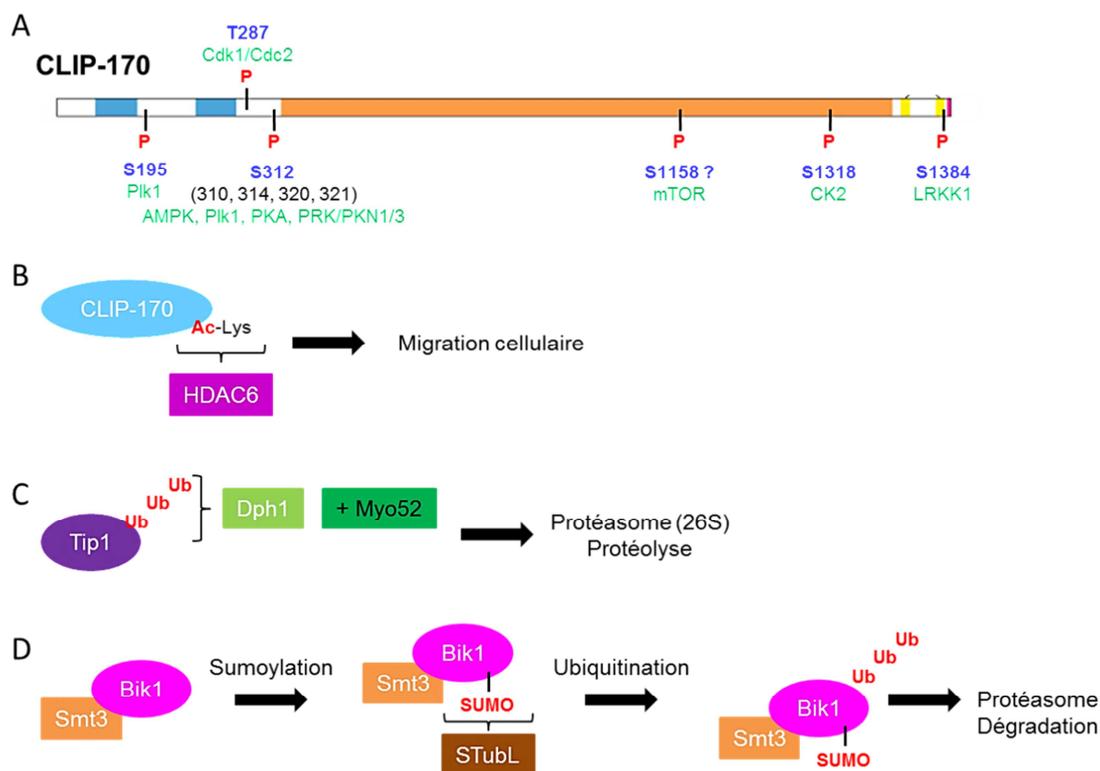


Figure 95 : Modifications post-traductionnelles de CLIP-170. (A) Sites de phosphorylations connus de CLIP-170 humain (en bleu) et kinases impliquées (en vert) (d'après [Choi et al., 2002](#) ; [Yang et al., 2009](#) ; [Li et al., 2010](#) ; [Lee et al., 2010](#) ; [Nakano et al., 2010](#) ; [Hsu et al., 2011](#) ; [Collazos et al., 2011](#) ; [Kakeno et al., 2014](#) ; [Amin et al., 2014](#) ; [Kedashiro et al., 2015](#) ; [Nirschl et al., 2016](#)). (B) Dans les cellules pancréatiques cancéreuses, l'expression d'HDAC6 est augmentée et cette déacétylase interagit avec CLIP-170 afin de faciliter la migration cellulaire, sans pour autant déacétyler CLIP-170 (d'après [Li et al., 2014](#)). (C) Chez la levure fissipare, le récepteur de l'ubiquitine, Dph1 interagit via son domaine UBA (*Ubiquitin-Associated*) avec la queue C-terminal de Tip1 et une myosine de type V, Myo52. Cette interaction au niveau des extrémités (+) des microtubules, favorise la protéolyse de Tip1 via le protéasome (26S) et induit la catastrophe des microtubules (d'après [Martín-García and Mulvihill, 2009](#)). (D) Chez la levure bourgeonnante, Bik1 interagit avec des enzymes de la voie de sumoylation (Smt3) et est sumoylée. Cette sumoylation (SUMO : *Small Ubiquitin-like Modifier*) est reconnue par une STubL (*SUMO-Targeted ubiquitin Ligase*) qui va induire la dégradation de la protéine via son ubiquitination et en la dirigeant vers le protéasome (d'après [Alonso et al., 2012](#)).

En plus de la phosphorylation, CLIP-170 est sujette à d'autres modifications post-traductionnelles. Dans les cellules pancréatiques cancéreuses, CLIP-170 peut être déacétylée. Elle interagit d'ailleurs avec la partie C-terminale d'HDAC6 (*Histone Deacetylase 6*), via ses domaines *coiled-coil* et doigt de zinc. Mais, malgré leur association, CLIP-170 n'est pas un substrat d'HDAC6. Néanmoins, ce complexe CLIP-170/HDAC6 régule la mobilité des cellules pancréatiques ([Li et al., 2014](#) ; cf. **Figure 95-B**). Les acétylases de CLIP-170 n'ont pas été identifiées.

D'autre part, la poly-ubiquitination de CLIP-170 a été montrée sur son homologue Tip1 de la levure fissipare. En effet, un nouveau mécanisme via la myosine de type V, Myo52 permet de réguler la protéolyse dépendante de l'ubiquitination de Tip1, ainsi que de moduler la coordination spatiale de la dynamique des MTs. Pour cela, au niveau de la périphérie cellulaire, Myo52 favorise les catastrophes des MTs en retirant Tip1 de l'extrémité (+) des MTs et travaille de concert avec Dph1 (un récepteur responsable de la présentation de protéines poly-ubiquitinylées au protéasome) pour cibler la dégradation de Tip1 (**Martín-**

García and Mulvihill, 2009 ; cf. **Figure 95-C**). Un autre mécanisme chez la levure bourgeonnante, régulant l'abondance de Bik1 (homologue de CLIP-170) a été montré. Ce dernier passe via la sumoylation du fait que Bik1 interagit avec différentes protéines de la voie de sumoylation, comme Smt3 (SUMO/E1), Ubc9 (E2) ou Nfi1 (E3). *In vitro* Bik1 s'associe directement avec SUMO et *in vivo*, la surexpression de cette enzyme résulte en la sumoylation de Bik1. Néanmoins, contrairement à l'ubiquitination, la sumoylation ne marque pas directement les substrats pour la dégradation. Afin de promouvoir la dégradation des protéines sumoylées, ces dernières sont reconnues par les STubLs (*SUMO-Targeted ubiquitin Ligases*) qui vont ubiquitinyler les substrats sumoylés et ainsi rediriger Bik1 vers le protéasome (**Alonso et al., 2012** ; cf. **Figure 95-D**).

E – Localisation de CLIP-170 aux microtubules

Indépendamment de son taux d'expression, CLIP-170 se localise préférentiellement au niveau des extrémités (+) des MTs en croissance, la caractérisant comme une +TIP (cf. **page 87**), aussi bien *in vitro* (**Pierre et al., 1994** ; **Arnal et al., 2004** ; **Folker et al., 2005** ; **Ligon et al., 2006** ; **Gupta et al., 2010**), que dans des cellules de mammifères, telles que les cellules HeLa (**Pierre et al., 1994** ; **Perez et al., 1999** ; **Diamantopoulos et al., 1999** ; **Goodson et al., 2003**), les cellules Vero (**Pierre et al., 1994** ; **Perez et al., 1999**) ou les cellules COS-7 (**Dragestein et al., 2008** ; **Gupta et al., 2009**) (cf. **Figure 96-A**). CLIP-170 se localise également dans les îlots de tubuline-GTP dans la *lattice* des MTs, notamment au niveau des intersections microtubulaires, qui sont des sites de sauvetage (**Dimitriov et al., 2008** ; **Pilon and Poüs, 2013** ; **De Forges et al., 2016** ; cf. **Figure 96-B, C**). Dans les cellules RPE1, après le passage de la comète, des rétentions transitoires de CLIP-170 sont laissés au niveau des intersections microtubulaires dans 80% des cas. De manière générale, au laboratoire il a été montré que CLIP-170 co-localise avec les croisements microtubulaires à hauteur de 40% (**De Forges et al., 2016**).

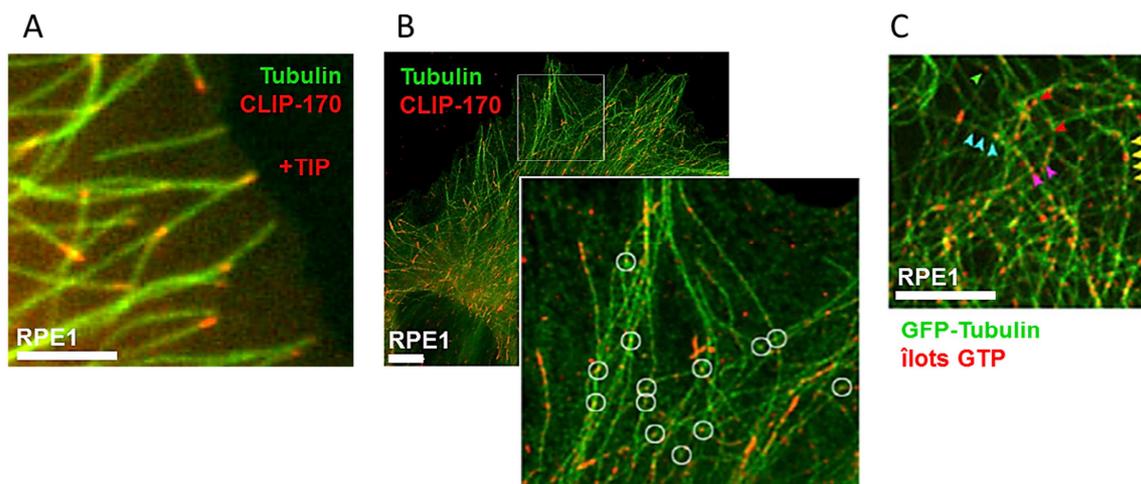


Figure 96 : Localisation de CLIP-170 dans les cellules humaines en interphase (RPE1). (A) Immunofluorescence mettant en évidence la localisation de CLIP-170 (en rouge) aux bouts des microtubules (en vert). (B) Immunofluorescence montrant les points de rétention de CLIP-170 (en rouge), qui colocalisent avec les croisements microtubulaires (cercles blanc) (d'après **De Forges et al., 2016**). (C) Localisation des rétentions de mCherry-CLIP-170 (flèches colorées) après le passage des comètes dans des cellules RPE1, puis la GFP-tubuline et les îlots de tubuline-GTP (Ac hMB11) sont marqués en vert et rouge respectivement. Barres d'échelle : 5 μ m (d'après **De Forges et al., 2016**).

Dans les cellules, CLIP-170 forme des comètes au bouts (+) des MTs en croissance (cf. **Figures 96-A et 97-A**), tandis que lorsqu'elle est surexprimée, elle induit la réorganisation des MTs sous forme de faisceaux, qui ont tendance à former un réseau circulaire autour du noyau (**Pierre et al., 1994** ; cf. **Figure 97-B**). De plus, dans les cellules ou *in vitro*, il a été montré que les domaines H1 (1-350 ; cf. **Figure 91**) ou H2 (1-468 ; cf. **Figure 91**) seuls, se fixent majoritairement au niveau des extrémités (+) des MTs en croissance (**Diamantopoulos et al., 1999** ; **Arnal et al., 2004** ; **Gupta et al., 2009** ; **Gupta et al., 2010**), mais aussi plus faiblement le long des MTs, du fait de la perte de l'auto-inhibition via la queue C-terminale (**Pierre et al., 1994** ; cf. **Figure 97-C**). En revanche, la protéine dépourvue de la partie N-terminale (H1) : Δ Head (Δ 1-350 ; cf. **Figure 91**) perd sa capacité à lier les MTs et présente donc une localisation cytoplasmique (**Pierre et al., 1994** ; cf. **Figure 97-D**). Ainsi, la partie N-terminale est indispensable pour la localisation de CLIP-170 aux MTs et plus précisément au sein de H1, c'est le CAP-Gly2 et la région basique, riche en sérines, adjacente qui sont suffisants (**Gupta et al., 2009**).

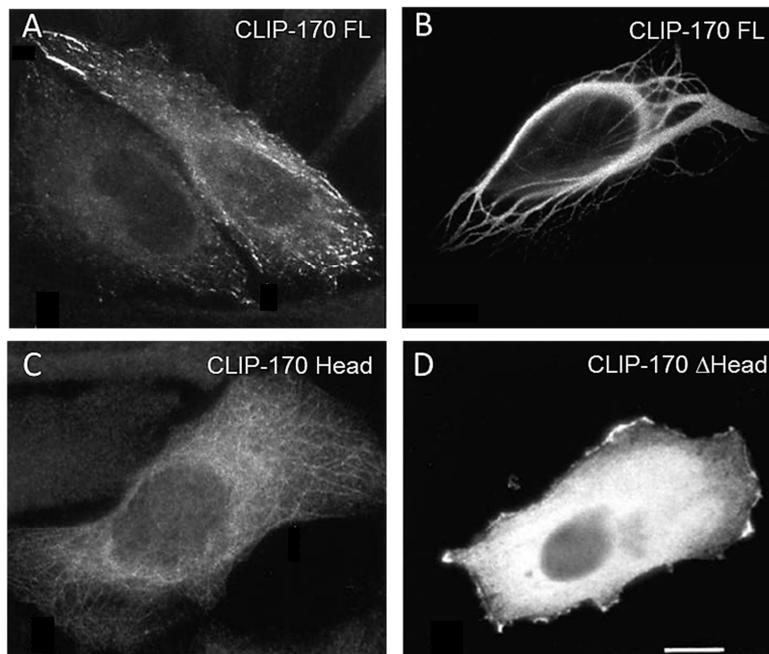


Figure 97 : Localisation de CLIP-170 dans les cellules HeLa. (A) Expression ou (B) surexpression transitoire de Myc-CLIP-170 entier (CLIP-170 FL), (C) Myc-CLIP-170 Head (domaine H1), (D) Myc-CLIP-170 Δ Head. Les cellules sont fixées 24h (A, D, C) ou 36h (B) après transfection avec du paraformaldéhyde, ou du méthanol (C), et immunomarquées avec l'anticorps anti-Myc 9E10 de souris. Barre d'échelle : 10 μ m (d'après **Pierre et al., 1994**).

E1 – CLIP-170 : première +TIP identifiée

GFP-CLIP-170 a été la première protéine observée étant capable de suivre de manière dynamique les extrémités (+) des MTs en croissance, formant des comètes dans les cellules vivantes (**Perez et al., 1999** ; cf. **Figure 96-A**).

Dans les fibroblastes, une autre étude a montré que le transgène GFP-CLIP-115 est une +TIP, c'est-à-dire il co-localise avec les extrémités (+) des MTs en croissance, de la même manière que CLIP-170 (**Hoogenraad et al., 2000**). En cas d'absence de CLIP-115, le recrutement de CLIP-170 est accru (**Hoogenraad et al., 2002**).

Durant l'interphase, similairement à CLIP-170, ces homologues de levure Bik1 et Tip1 se localisent le long des MTs cytoplasmiques dynamiques et suivent les extrémités (+) de ces derniers au cours de leur polymérisation. Cette caractéristique permet également de classer Bik1 et Tip1 dans la famille des +TIPs (**Schuyler and Pellman, 2001**). De la même façon que Bik1 et Tip1, CLIPA est recrutée au niveau des extrémités (+) des MTs de *A. nidulans* (**Efimov et al., 2006**). Pendant la mitose, l'homologue de drosophile, D-CLIP-190 est localisé au niveau des kinétochores non attachés, de manière dépendant du complexe dynéine/dynactine et LIS1. Pendant l'interphase, D-CLIP-190 s'associe avec les extrémités (+) des MTs, via EB1 qui interagit avec ses domaines CAP-Gly. Cette association est atténuée pendant la mitose (**Dzhindzher et al., 2005**). Contrairement aux autres cellules, dans les neurones, CLIP-170 de mammifère et D-CLIP-190 de drosophile ne sont pas vraiment des +TIPs (**Beaven et al., 2015**). Dans ces cellules, D-CLIP-190 est plutôt liée à l'actine (**Lantz and Miller, 1998**).

Chez les mammifères, trois mécanismes sont possibles pour que CLIP-170 se lie et suive les extrémités (+) des MTs en croissance (**Folker et al., 2005 ; cf. Figure 98**).

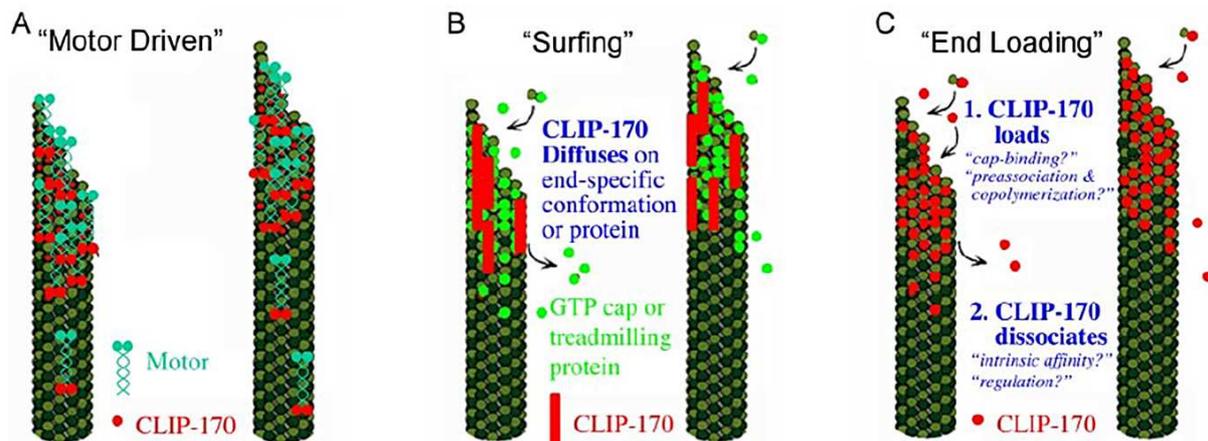


Figure 98 : Mécanismes potentiels permettant à CLIP-170 de se fixer et de suivre les extrémités (+) des microtubules dynamiques. (A) Transport de CLIP-170 (en rouge) dirigé vers les extrémités (+) des microtubules via des protéines motrices (en bleu-vert). (B) CLIP-170 (barres rouge) se localise aux extrémités (+) des microtubules en diffusant le long d'une conformation spécifique ou en interagissant avec d'autres +TIPs, tels que les protéines EB (en vert). (C) CLIP-170 (en rouge) co-polymérise avec la tubuline (en gris) ou lie la coiffe, puis se dissocie de l'extrémité (+) des microtubules en croissance (**Folker et al., 2005**).

Le premier mécanisme, correspond au transport de CLIP-170 par des moteurs moléculaires (*motor driven*) (cf. **Figure 98-A**). C'est le cas pour les Bik1 et Tip1, qui sont amenées aux extrémités (+) des MTs grâce à l'activité motrice des kinésines Kip2 et Tea2 respectivement (**Bush et al., 2004 ; Carvalho et al., 2004**). Ce mécanisme semble impliqué EB1/Mal3 qui recrute la kinésine/Tea2, permettant *in fine* le transport de CLIP-170/Tip1 au niveau des extrémités (+) des MTs en croissance, aussi bien *in vitro* (**Bieling et al., 2007**), que *in vivo* chez *S. pombe* (**Browning et al., 2003**). Similairement à Bik1 et Tip1, la kinésine KipA de *A. nidulans* (homologue de Kip2 et Tea2) est nécessaire pour augmenter l'accumulation de CLIPA au niveau des extrémités (+) des MTs (**Efimov et al., 2006**). Dans les cellules des vertébrés le transport de CLIP-170 par la kinésine n'a pas été démontré, et *in vitro*, EB1 seul est suffisant pour recruter CLIP-170 (**Wittmann, 2008**).

Le second mécanisme de localisation implique la reconnaissance spécifique d'une conformation transitoire de la coiffe ou de protéines au niveau des extrémités (+), puis la diffusion de CLIP-170 le long des MTs (*surfing*) (cf. **Figure 98-B**). Dans le mécanisme de « *surfing* », CLIP-170 se lie soit directement via ses domaines CAP-Gly, en liant le motif EEY/F dans la partie C-terminale de l' α -tubuline polymérisée au niveau d'îlots de tubuline-GTP (Mishima *et al.*, 2007), soit indirectement en interagissant avec les protéines EBs (Goodson *et al.*, 2003 ; Komarova *et al.*, 2005 ; Watson and Stephens, 2006 ; Ligon *et al.*, 2006 ; Weisbrich *et al.*, 2007 ; Bieling *et al.*, 2008 ; Dixit *et al.*, 2009 ; Gupta *et al.*, 2010 ; Moughamian *et al.*, 2013 ; cf. **Annexe I**). Pour l'interaction direct, via les CAP-Gly, la tyrosine en C-terminal de l' α -tubuline est indispensable (Peris *et al.*, 2006), au sein du motif EEExEEY/F (Mishima *et al.*, 2007). L'interaction indirecte est similaire à celle entre les CLIPs et l' α -tubuline, c'est-à-dire la tyrosine C-terminale dans le motif EEY/F des protéines EBs est nécessaire pour la liaison des domaines CAP-Gly des CLIPs (Mishima *et al.*, 2007 ; Bieling *et al.*, 2008 ; cf. **Figure 99**).

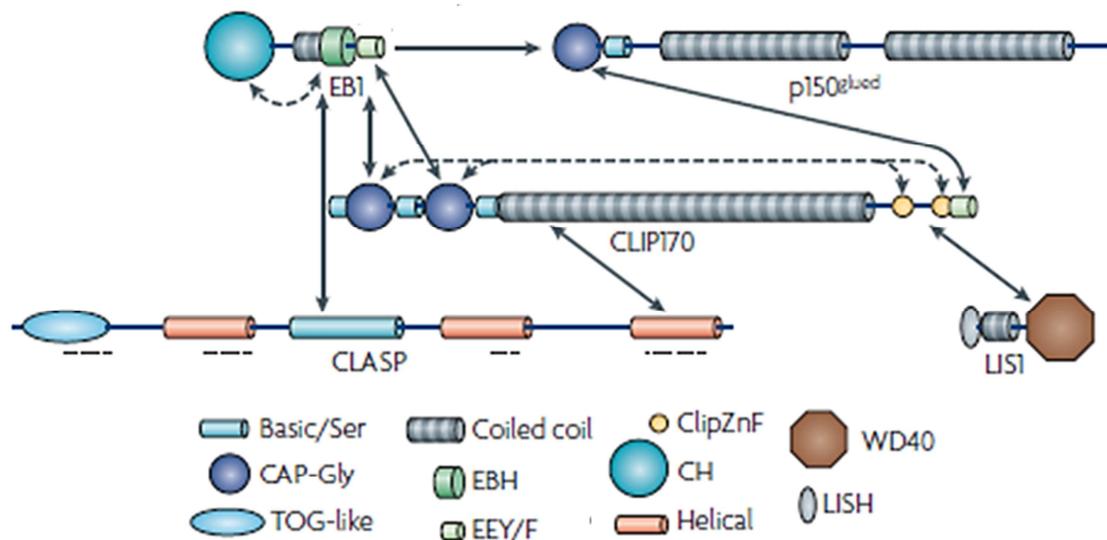


Figure 99 : Domaines structuraux de CLIP-170 à l'origine des interactions avec ses partenaires au sein du réseau de +TIPs (d'après Akhmanova and Steinmetz, 2008).

Le mécanisme moléculaire permettant à CLIP-170 le suivi des extrémités (+) des MTs via son interaction avec EB1 a été révélé *in vitro* (Bieling *et al.*, 2008). De manière intéressante, il a été montré que le CAP-Gly1 de CLIP-170 est plus affiné pour EB1 et moins pour l' α -tubuline, tandis que le CAP-Gly2 est plus affiné pour l' α -tubuline et moins pour EB1 (Mishima *et al.*, 2007 ; Weisbrich *et al.*, 2007). Par ailleurs, il semblerait qu'*in vitro* chaque CAP-Gly peut aussi se lier à l' α - et la β -tubuline, au niveau des hélices H12 des tubulines (cf. **Figure 4** ; cf. **page 32**). Dans ce cas, les dimères de CLIP-170 pourraient être capables de se lier simultanément aux MTs et à EB1, via les quatre domaines CAP-Gly (Gupta *et al.*, 2010). D'ailleurs, *in vitro* le domaine H2 (1-468) de CLIP-170 lie directement les dimères de tubuline et recrute également EB1 présent dans les MTs préassemblés (Ligon *et al.*, 2006). D'autres études *in vitro* ont confirmé le fait que la localisation de CLIP-170 au niveau des extrémités (+) des MTs est dépendante d'EB1 (Bieling *et al.*, 2007 ; Wittmann, 2008 ; Dixit *et al.*, 2009 ; Lopus *et al.*, 2012 ; Duellberg *et al.*, 2014). En interagissant ensemble EB1 et

CLIP-170 coopèrent pour stabiliser la dynamique des MTs (**Lopus et al., 2012**). Grâce aux études *in vitro*, il a pu être démontré qu'aucun autre facteur est nécessaire pour le comportement dynamique de CLIP-170, indiquant que l'affinité pour les extrémités des MTs polymérisés des protéines EBs est suffisante (**Bieling et al., 2008**). De plus, *in vitro*, la longueur des comètes dépend uniquement de la vitesse de polymérisation et non de la concentration en EB1 (**Bieling et al., 2007**). Néanmoins, il a été démontré *in vitro* qu'une compétition se crée entre l'interaction de CLIP-170 avec EB1 ou la tubuline et l'interaction de p150^{Glued} avec EB1 (**Bieling et al., 2008 ; Weisbrich et al., 2007**), suggérant une complexité supplémentaire dans le réseau d'interaction des +TIPs (cf. **page 112**).

Dans des cellules de mammifères CHO, il a été décrit qu'une fraction de CLIP-170 et CLIP-115 sont recrutées au niveau des comètes en interagissant directement avec le motif EEY/F terminal des protéines EB1 et EB3, tandis qu'EB2 montre moins d'affinité pour les CLIPs. En absence d'EB1 et EB3, il y a une diminution importante de l'accumulation des CLIPs au niveau des extrémités (+) des MTs en croissance. De plus, les auteurs ont montré qu'*in vivo*, les protéines EBs permettent de maintenir l'association de CLIP-170 avec les extrémités (+) des MTs dynamiques, en régulant négativement sa dissociation (**Komarova et al., 2005**). Du fait que dans les cellules HeLa, EB3 ne s'exprime pas, il a été montré qu'EB1 est suffisant pour assurer la localisation de CLIP-170 (**Watson and Stephens, 2006**). Il a également été montré *in vivo* qu'EB1 lie CLIP-170 et forme un co-complexe avec la tubuline qui est recruté sur les extrémités (+) des MTs en croissance. De plus, les auteurs indiquent que l'interaction entre EB1 et CLIP-170 est complètement inhibée par p150^{Glued}, qui se localise également aux extrémités (+) des MTs *in vivo* (**Ligon et al., 2006**). Dans des extraits d'œufs de xénope, EB1 est aussi nécessaire pour le recrutement de CLIP-170 (**Komarova et al., 2005**). De même, chez la levure fissipare, il a été montré que Mal3/EB1 est nécessaire pour permettre à Tip1/CLIP-170 de se localiser aux bouts (+) des MTs (**Busch and Brunner, 2004 ; Golstone et al., 2010**). Dans les neurones, les MTs dynamiques décorés des protéines EBs sont enrichis au niveau des cônes de croissance, sur ces MTs CLIP-170 est recrutée via EB1 et EB3 (**Moughamian et al., 2013**).

Plusieurs études ont montré que la liaison d'EB1 avec les MTs et d'autres +TIPs est régulée par sa phosphorylation (cf. **page 134**). Concernant CLIP-170, il a été montré que la phosphorylation de la Ser40 d'EB1 par ASK1 (*Apoptosis Signal-regulating Kinase 1*), qui est une MAPKKK en amont de JNK (cf. **page 183**), augmente la liaison d'EB1 avec CLIP-170 ou p150^{Glued}, favorisant leur accumulation aux bouts (+) des MTs en croissance. Ce recrutement via EB1, dépendant d'ASK1 est essentiel pour la stabilisation des MTs astraux pendant la mitose (**Ran et al., 2017**). Au contraire, dans les cellules HeLa, il a été montré que la phosphorylation d'EB1 sur les Thr206 et Tyr217 empêche son interaction avec CLIP-170 et p150^{Glued} (**Chen et al., 2014a**).

Le troisième mécanisme est la fixation de CLIP-170 au niveau des extrémités (+) des MTs dynamiques, en copolymérisant avec les dimères α/β -tubuline, puis une dissociation au niveau de la *lattice* (*end loading*) (**Diamantopoulos et al., 1999 ; cf. Figure 98-C**). Dans ce troisième mécanisme (« *end loading* »), CLIP-170 s'associe avec la tubuline, ou avec la coiffe de tubuline-GTP, puis co-polymérise dans l'extrémité (+) du MT et se dissocie de la *lattice* du MT, qui est plus vieille, au fur et à mesure que le MT pousse (**Perez et al., 1999 ; Folker et**

al., 2005 ; Galjart, 2005). En effet, CLIP-170 a plus d'affinité pour les extrémités (+) des MTs en croissance, ayant une structure courbée et contenant de la tubuline-GTP, que pour le reste du réseau microtubulaire, soit les protofilaments droits, qui sont plus anciens et qui contiennent de la tubuline-GDP (Wittmann and Desai, 2005 ; Folker *et al.*, 2005). Différentes études *in vivo* (Diamantopoulos *et al.*, 1999) et *in vitro* (Arnal *et al.*, 2004 ; Folker *et al.*, 2005) ont montré que CLIP-170 se lie étroitement et stablement avec des dimères de tubuline, mais aussi des microtubules. Dans les cellules HeLa, CLIP-170 peut se lier à de la tubuline non polymérisée (Diamantopoulos *et al.*, 1999). *In vitro*, lorsque le domaine H2 (1-468) de CLIP-170 co-polymérise avec la tubuline, cela engendre la formation d'« anneaux » pouvant être des intermédiaires lors de l'assemblage des MTs, permettant à H2 de stimuler la nucléation des MTs (Arnal *et al.*, 2004 ; cf. Figure 100). Par ailleurs, dans les cellules, CLIP-170 reconnaît des sites de liaison structurels dans les MTs sensibles au Taxol®. En effet, dans les cellules HeLa en présence d'une concentration micromoléculaire de Taxol®, cela engendre le décrochement de CLIP-170 des extrémités (+) des MTs (Perez *et al.*, 1999), mais une faible concentration (10 nM) conduit à une expression stable de CLIP-170 qui reste associée aux MTs (Dragestein *et al.*, 2008).

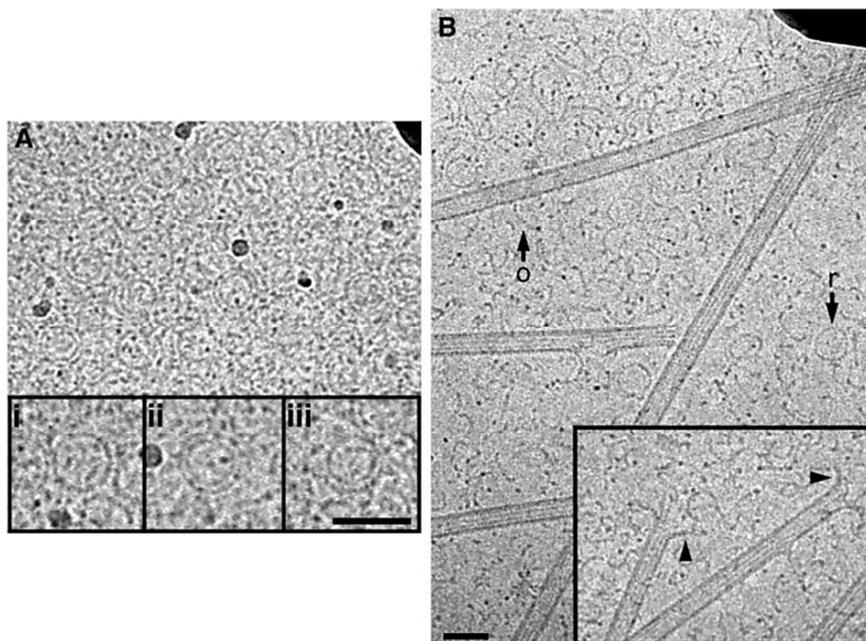


Figure 100 : Co-polymérisation de CLIP-170 (H2) avec la tubuline. (A) « Anneaux » de tubuline formés par H2 (1-468) observés au microscope électronique, (i) « anneau » simple, (ii) « anneau » double, (iii) spirales. (B) Observation de la polymérisation des microtubules en présence d' H2. Les oligomères courbés et les « anneaux » sont indiqués par des o et r, respectivement, les têtes de flèches indiquent les extrémités (+) des microtubules en croissance où des oligomères courbés et des « anneaux » sont retrouvés. Barres d'échelles : 5 nm (d'après Arnal *et al.*, 2004).

Il est important de noter que CLIP-170 est rapidement échangée au niveau des extrémités (+) des MTs en croissance, aussi bien dans les cellules (Perez *et al.*, 1999 ; Komarova *et al.*, 2005 ; Dragestein *et al.*, 2008), qu'*in vitro* (Bieling *et al.*, 2008 ; Dixit *et al.*, 2009). En d'autres termes, CLIP-170 (ainsi que d'autres +TIPs, comme les protéines EBs) échangent rapidement entre une partie soluble et une partie associée à l'extrémité (+). Dans les extrémités (+) des MTs, la cinétique d'échange est gouvernée par les changements

conformationnels des sites de liaison à CLIP-170 et la diffusion de la protéine (**Dragestein et al., 2008**). De plus, CLIP-170 ne reste pas associée indéfiniment avec les bouts (+) des MTs. Dans ce cas, elle peut interagir avec certaines +TIPs afin de faciliter sa libération. C'est le cas pour les protéines de la famille EB. Effectivement, ces dernières jouent un rôle essentiel dans la libération de CLIP-170, en queue de comète. Néanmoins, le mécanisme exact de la dissociation de CLIP-170 de la surface microtubulaire n'est pas connu (**Komarova et al., 2005**). La phosphorylation a été proposée pour réguler la dissociation des +TIPs des extrémités du MT, mais cela n'a jamais été démontré (**Wittmann, 2008**).

F – Fonctions des CLIPs

De par leur localisation subcellulaire, les CLIPs ont un rôle majeur dans le sauvetage des MTs dans les cellules en interphase (**Komarova et al., 2002a**), permettant aux MTs d'explorer l'espace cellulaire. Elles participent aussi à la capture et le transport de divers organites (**Pierre et al., 1992 ; Rickard and Kreis, 1996 ; Dujardin et al., 1998**), assurant par exemple l'endocytose (**Pierre et al., 1992**) ou la phagocytose (**Lewkowicz et al., 2008**). Même si la délétion des CLIPs n'est pas létale, des dérégulations des CLIPs sont retrouvées associées à certaines pathologies, comme le lymphome (**Delabie et al., 1992 ; Bilbe et al., 1992 ; Delabie et al., 1993 ; Suzuki and Takhashi, 2008 ; Sun et al., 2012**), le syndrome de Williams pour CLIP-115 (**Hoogenraad et al., 2002**) et l'infection virale (**Jovasevic et al., 2015**), ainsi que dans la spermatogénèse et les maladies mentales, comme nous avons pu le voir précédemment (**Akhmanova et al., 2005 ; Larti et al., 2015**).

F1 –CLIP-170 est un facteur de sauvetage des microtubules

Lors de l'interphase, CLIP-170 au niveau des extrémités (+) des MTs en croissance a d'abord été décrite comme une protéine empêchant les catastrophes (**Rickard and Kreis, 1990**). Ensuite, CLIP-170 s'est révélée être un facteur majeur de sauvetage des MTs dans les cellules de mammifères (**Perez et al., 1999 ; Komarova et al., 2002a ; cf. Figure 101-A**). Chez les cellules CHO, cela a été montré du fait que la fréquence de sauvetage est cinquante fois diminuée en absence de CLIP-170, via la surexpression du dominant négatif de CLIP-170 (Δ Head), dans les extrémités (+) des MTs, ce qui résulte en des excursions de décroissance plus longues (**Komarova et al., 2002a ; cf. Figure 101-B**). D'autres études menées *in vitro* ont aussi permis de mettre en évidence que CLIP-170 favorise le sauvetage des MTs en assurant la polymérisation des MTs (**Arnal et al., 2004**). La partie N-terminale de CLIP-170, soit le domaine se liant aux MTs, est suffisant pour assurer cette fonction de sauvetage (**Komarova et al., 2002a ; Arnal et al., 2004 ; Gupta et al., 2009**). *In vitro*, le sauvetage des MTs est favorisé lorsque H2 lié à des oligomères de tubuline interagit avec les protofilaments courbés des MTs en train de dépolymériser (**Arnal et al., 2004 ; cf. Figure 100-B**). Il a été proposé que CLIP-170 pourrait aussi assurer sa fonction de sauvetage des MTs, indirectement en recrutant un autre facteur de sauvetage, comme CLASP (**Komarova et al., 2002a ; cf. page 98**). En effet, dans les fibroblastes, les CLASPs interagissent avec CLIP-115 et CLIP-170 et ont un rôle dans la stabilité des MTs (**Akhmanova et al., 2001**), en favorisant leur polymérisation (**Al-Bassam et al., 2010**). De plus, dans les cellules HeLa il a été montré, en déplaçant les CLASPs des cellules par siRNA, qu'elles sont impliquées dans le sauvetage des MTs (**Mimori-Kiyosue et al., 2005**). Néanmoins, il est important de noter que le mécanisme

moléculaire exact des événements de sauvetage régulé par CLIP-170 n'est toujours pas bien connu. Comme CLIP-170 interagit avec les oligomères de tubuline, elle peut probablement, via ses domaines N-terminaux, stabiliser les protofilaments courbés (**Diamantopoulos et al., 1999 ; Arnal et al., 2004**).

De manière intéressante, même si CLIP-170 est un facteur majeur de sauvetage, ce facteur influence aussi le comportement de dépolymérisation des MTs, en régulant la vitesse et la distance de dépolymérisation. Cela suggère que la fonction des CLIPs dans la dynamique des MTs est bien plus complexe (**Ferreira et al., 2014**). On notera que CLIP-170 ne semble pas avoir d'effet sur la dynamique des MTs dans les axones de souris, suggérant une redondance dans ces cellules avec CLIP-115 (**Moughamian et al., 2013**).

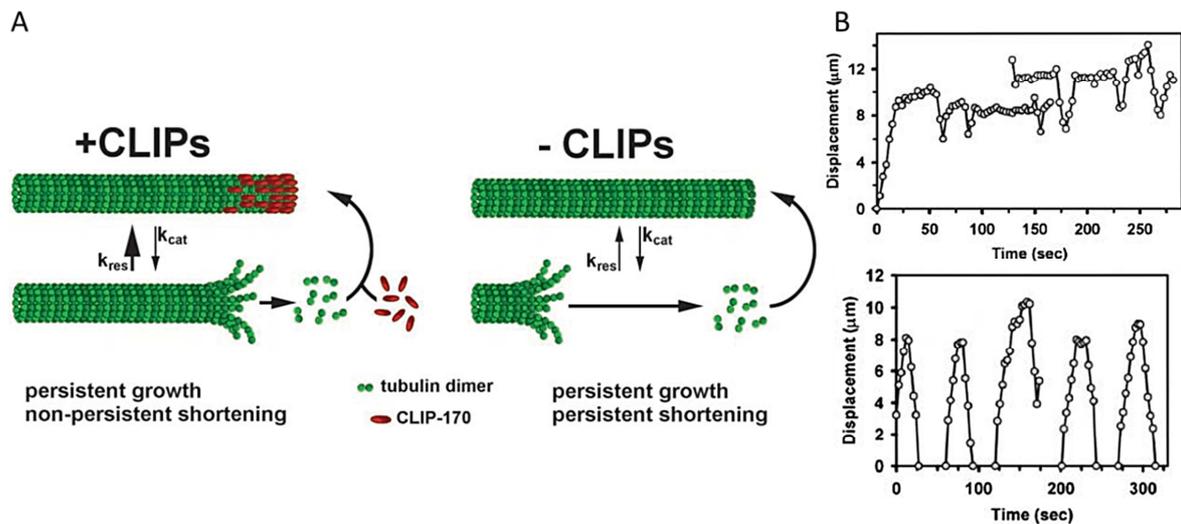


Figure 101 : Régulation de la dynamique des microtubules par le facteur de sauvetage CLIP-170. (A) Modèle montrant qu'en présence de CLIP-170 active (+CLIPs, à gauche), la fréquence de sauvetage est élevée assurant une dépolymérisation non persistante (sauvetage), tandis qu'en absence de CLIP-170 (-CLIPs, à droite), la fréquence de sauvetage est nettement réduite et donc la dépolymérisation est persistante. (B) Représentation de la vie des microtubules au cours du temps en présence de CLIP-170 (en haut), ou en absence de CLIP-170 (expression de Δ Head, dominant négatif de CLIP-170 ; en bas), mettant en évidence des phases de dépolymérisation persistantes (d'après **Komarova et al., 2002a**).

Comme vu précédemment, CLIP-115 a une structure très similaire à celle de CLIP-170 en N-terminal et via l'utilisation du dominant négatif de CLIP-170 (Δ Head) dans les cellules CHO, il semblerait que ces deux protéines ont des fonctions redondantes, en tant que facteur de sauvetage (**Komarova et al., 2002a**).

Il a été montré qu'en absence de Bik1 par mutation, les cellules sont viables, mais leurs MTs sont extrêmement courts, voir indétectables. Néanmoins Bik1 co-localise toujours avec les MTs restants (**Berlin et al., 1990**), et donc Bik1 participe à la stabilisation des MTs (**Carvalho et al., 2004**). Par ailleurs, il a été montré que Tip1 empêche les catastrophes prématurées au niveau du cortex cellulaire, inhibant ainsi toute dépolymérisation avant que les MTs n'aient atteint l'extrémité de la cellule. Cela conduit *in fine* à la polarisation des MTs le long de l'axe longitudinal de la cellule, sans impacter la viabilité cellulaire (**Brunner and Nurse, 2000**). Chez la levure fissionnaire (*S. pombe*), la myosine V (Myo52) facilite la catastrophe des MTs en augmentant le détachement de Tip1 des extrémités (+) des MTs en croissance à la périphérie cellulaire (**Martín-García and Mulvihill, 2009**). Chez le

champignon (*A. nidulans*) CLIPA a été définie comme un facteur favorisant la croissance ainsi que la dynamique des MTs. En effet, en absence de CLIPA (par délétion de *ClipA*), les MTs n'arrivent pas à atteindre la périphérie cellulaire car les longues phases de polymérisation échouent du fait de l'augmentation des catastrophes (Efimov *et al.*, 2006).

F2 – Les CLIPs assurent la capture et le transport de diverses cargaisons/organites

Originellement CLIP-170 a été identifiée *in vitro* comme une protéine essentielle pour la liaison des endosomes aux MTs (Rickard and Kreis, 1996 ; Scheel *et al.*, 1999 ; cf. Figure 102), et, *in vivo*, cette protéine co-localise avec les vésicules d'endocytose ayant des récepteurs à la transferrine (Pierre *et al.*, 1992 ; cf. Figure 102). Ainsi, elle assure le lien entre les vésicules dans le cytoplasme et les MTs. Cette première fonction a été à l'origine de son nom. Mais cela est controversé car l'absence par siRNA de CLIP-170, EB1 et la dynactine n'affecte pas le trafic de la transferrine, des mitochondries, ainsi que l'organisation des endosomes précoces, ni le mouvement des lysosomes dépendants de la dynéine (Jovasevic *et al.*, 2015).

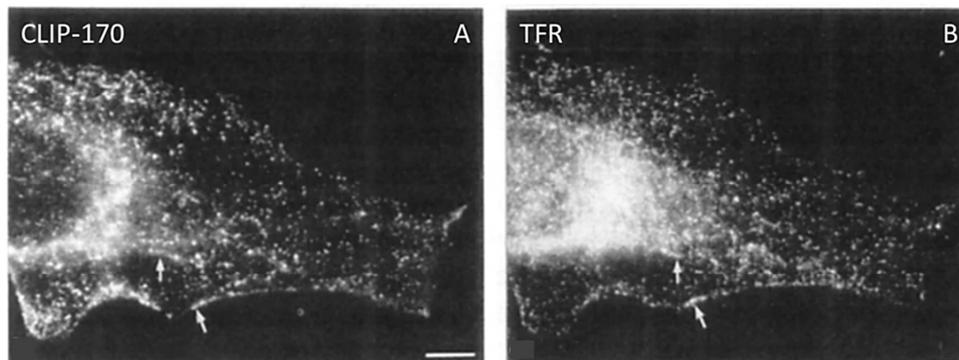


Figure 102 : Localisation de CLIP-170 et les récepteurs à la transferrine dans les vésicules d'endocytose dans les cellules HeLa. Visualisation de (A) CLIP-170 ou (B) TFR (*Transferrin Receptor*) en immunofluorescence sur les cellules fixées au méthanol. Barre d'échelle : 10 μm (d'après Pierre *et al.*, 1992).

Pour mener à bien ses fonctions, différentes études ont montré que CLIP-170 interagit directement avec la sous-unité p150^{Glued} de la dynactine (cf. Annexe I) et contribue ainsi au ciblage du complexe dynéine/dynactine cytoplasmique au niveau des extrémités (+) des MTs en croissance (cf. Figure 103). Dans les cellules de mammifères (CHO et HeLa), CLIP-170 se lie à EB1 et cette liaison est nécessaire, mais pas suffisante, pour recruter p150^{Glued} aux bouts (+) en croissance des MTs. Le recrutement de la dynactine est possible via la partie C-terminale de CLIP-170 qui interagit avec le domaine CAP-Gly de p150^{Glued} (Lansbergen *et al.*, 2004 ; cf. Figure 103-B). Cette interaction a également été montrée dans un système reconstitué *in vitro* (Duellberg *et al.*, 2014). Cette interaction entre p150^{Glued} et CLIP-170 est facilitée lors de la phosphorylation de CLIP-170 dans sa partie C-terminale (Kedashiro *et al.*, 2015). Ces +TIPs (CLIP-170 et p150^{Glued}) localisées à l'extrémité (+), sont impliquées dans l'initiation du transport rétrograde dirigée vers l'extrémité (-) des MTs, par le complexe dynéine/dynactine, le long des MTs de diverses cargaisons (Moughamian *et al.*, 2013 ; Kedashiro *et al.*, 2015 ; Nirchl *et al.*, 2016 ; cf. page 118). L'ensemble de ces résultats permet de donner un modèle expliquant comment le complexe dynéine/dynactine s'associe avec les extrémités (+) des MTs.

Comme CLIP-115 ne possède pas de motifs doigt de zinc dans sa partie C-terminale, elle ne peut pas se lier à la sous-unité p150^{Glued} de la dynactine. Pour recruter le complexe dynéine/dynactine, CLIP-115 va se lier aux protéines BicD (*Bicaudal D*) (**Hoogenraad et al., 2001**), qui sont des effecteurs de la dynéine (**Maday et al., 2014**).

La protéine LIS1 est décrite comme un régulateur de la fonction du complexe dynéine/dynactine (**Dujardin et al., 1998 ; Coquelle et al., 2002 ; Tai et al., 2002 ; cf. Figure 103-C**). Chez le champignon, le doigt de zinc C-terminal de CLIPA recrute aussi LIS1 au niveau des extrémités (+) des MTs (**Efimov et al., 2006**). LIS1 peut entrer en compétition localement avec p150^{Glued}, afin de libérer le complexe dynéine/dynactine de CLIP-170 (**Lansbergen et al., 2004**).

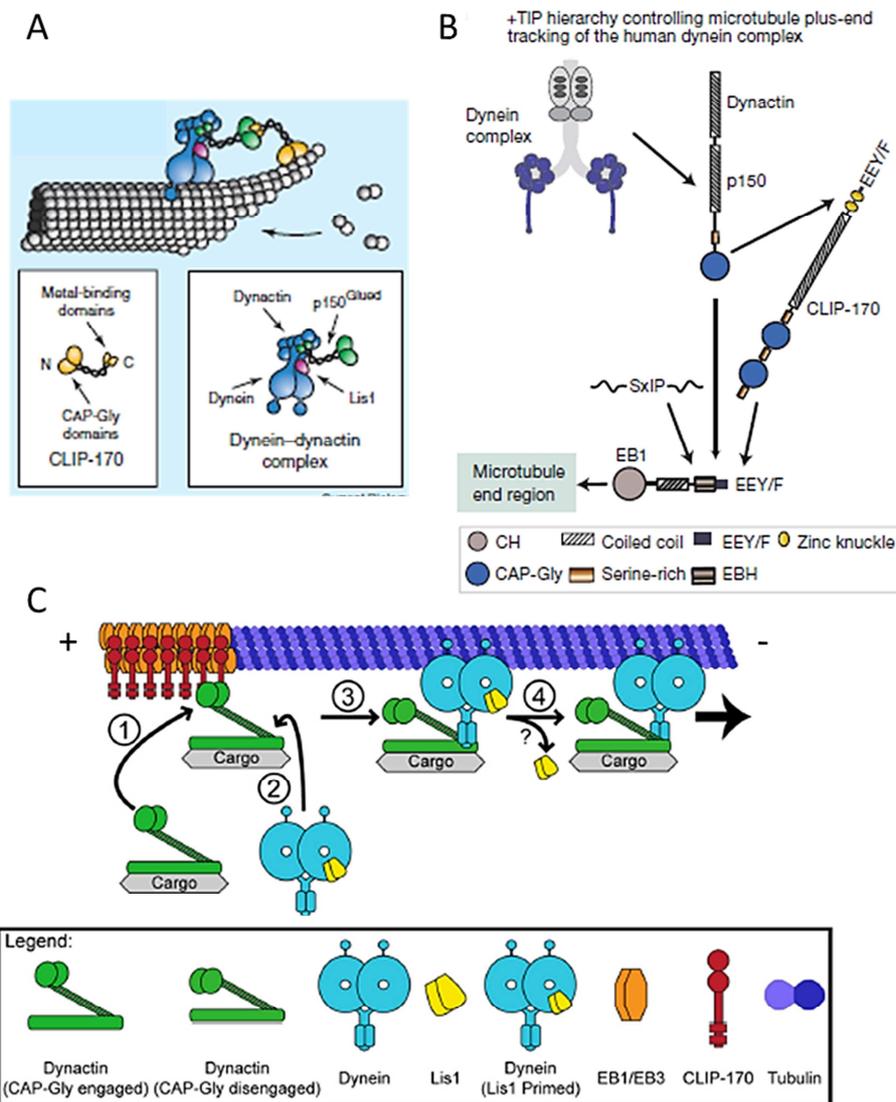


Figure 103 : Association de CLIP-170 avec le complexe dynéine/dynactine via p150^{Glued} et LIS1, afin de médier le transport des vésicules vers l'extrémité (-) des microtubules. (A) Les domaines CAP-Gly de p150^{Glued} (en vert) interagissent avec les doigts de zinc C-terminaux de CLIP-170 (en jaune) permettant de recruter le complexe dynéine/dynactine (en bleu) et LIS1 (en rose) à l'extrémité (+) du microtubule (d'après **Wittman and Desai, 2005**). (B) EB1 aux bouts (+) des microtubules en croissance recrute CLIP-170, qui recrute p150^{Glued}, qui recrute la dynéine. Les domaines impliqués sont indiqués. EB1 est capable de lier p150^{Glued} par lui-même (d'après **Duellberg et al., 2014**). (C) Interaction entre EB1/EB3, CLIP-170, et le complexe dynéine/dynactine afin d'initier le transport de cargaisons dans les axones (d'après **Moughamian et al., 2013**).

Il est important de noter que la plupart du temps, cette interaction est utilisée afin de transporter vers l'extrémité (-) des MTs des vésicules, cargaisons, organites capturés par CLIP-170. Par exemple, dans les axones de souris, le complexe EB/CLIP-170/dynactine est nécessaire pour l'initiation du transport, via le moteur moléculaire dynéine, vers les cônes de croissance des mitochondries, lysosomes, endosomes précoces et tardifs. CLIP-170 est recrutée via les protéines EBs sur les MTs dynamiques et elle recrute à son tour la dynactine (p150^{Glued}) afin de recruter la dynéine et initier le transport rétrograde assuré par le moteur moléculaire (Moughamian *et al.*, 2013 ; cf. **Figure 103-C**). Ce recrutement hiérarchisé du complexe dynéine/dynactine au niveau des extrémités (+) des MTs, via le complexe EB1/CLIP-170/p150^{Glued} a également été montré *in vitro* (Duellberg *et al.*, 2014). L'initiation du transport est régulée *in vitro* et dans les neurones par la phosphorylation de CLIP-170 contrôlant son repliement intramoléculaire sur les sérines localisées dans la troisième région riche en sérines, adjacente au deuxième CAP-Gly, en modulant le recrutement de la dynéine et des vésicules capturées par CLIP-170 sur les MTs tyrosinés (Nirschl *et al.*, 2016).

Dans une étude s'intéressant au processus de macropinocytose, les auteurs ont montré que CLIP-170/restine co-localise principalement avec les membranes des vésicules macropinocytaires intermédiaires, suggérant que CLIP-170/restine aurait une nouvelle fonction dans le trafic des macropinosomes via le cytosquelette (Sahin *et al.*, 2002). La macropinocytose est un processus d'endocytose permettant aux cellules eucaryotes d'ingérer du liquide extracellulaire et de dissoudre les molécules. Ce processus peut être détourné dans des pathologies, comme dans les cellules cancéreuses qui utilisent ce processus pour ingérer des protéines extracellulaires, ou encore les virus et bactéries qui entrent dans les cellules hôtes via ce processus (Bloomfield and Kay, 2016). Chez les mammifères, il a également été montré que CLIP-170 assure un rôle dans le transport et la localisation de la cavéoline-1, ainsi que le réarrangement des MTs. En effet, dans les cellules REFs (*Rat Embryonic Fibroblasts*), deux gènes suppresseurs de tumeurs (*TSC1* et *TSC2*) sont des régulateurs de la voie de signalisation de mTOR dans laquelle CLIP-170 pourrait servir d'effecteur afin de réguler l'organisation des MTs, ainsi que le transport protéique et membranaire, via les vésicules à cavéoline-1 (Jiang and Yeung, 2006). Dans une autre étude, il a été montré que de manière dépendante de la dynéine et EB1, CLIP-170 joue un rôle dans le trafic d'HSV1 (*Herpes Simplex Virus type 1*), en assurant sa capture par les MTs dynamiques pendant l'initiation du transport adressé vers l'extrémité (-) (cf. **Figure 104**). En effet, la déplétion des cellules NHDFs (*Normal Human Dermal Fibroblasts*) par siRNA en CLIP-170, EB1 et dynactine, après l'entrée du virus, bloque le transport des particules virales et supprime l'infection (Jovasevic *et al.*, 2015).

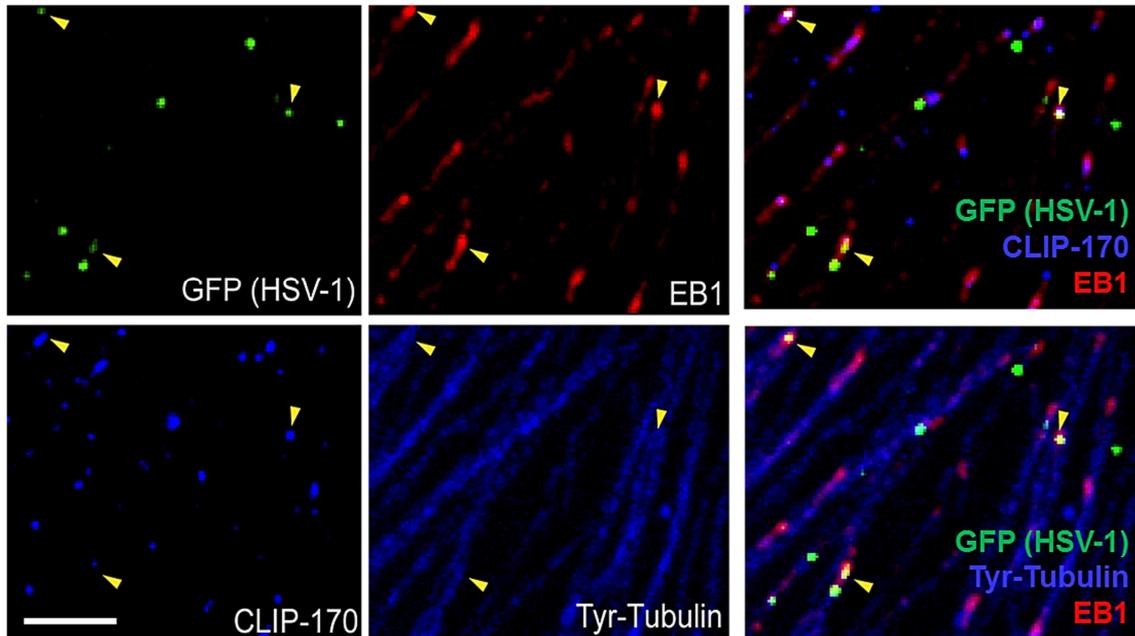


Figure 104 : Rôle de CLIP-170 dans le transport d'HSV1. Images de microscopie confocale de cellules K26GFP infectées et marquées pour HSV1 (en vert), EB1 (en rouge), CLIP-170 (en bleu) et la tubuline tyrosinée (en bleu). Les têtes de flèches jaunes indiquent la co-localisation entre les particules virales et CLIP-170 et/ou EB1. Barre d'échelle : 3 μm (d'après **Jovasevic et al., 2015**).

Une étude *in vitro* a montré que CLIP-115/170 est impliquée dans la liaison des peroxysomes aux MTs (**Thiemann et al., 2000** ; cf. **Figure 105-A**). Plus récemment, la capture des vésicules par CLIP-170 a été reconstituée *in vitro* (**Nirschl et al., 2016** ; cf. **Figure 105-B**).

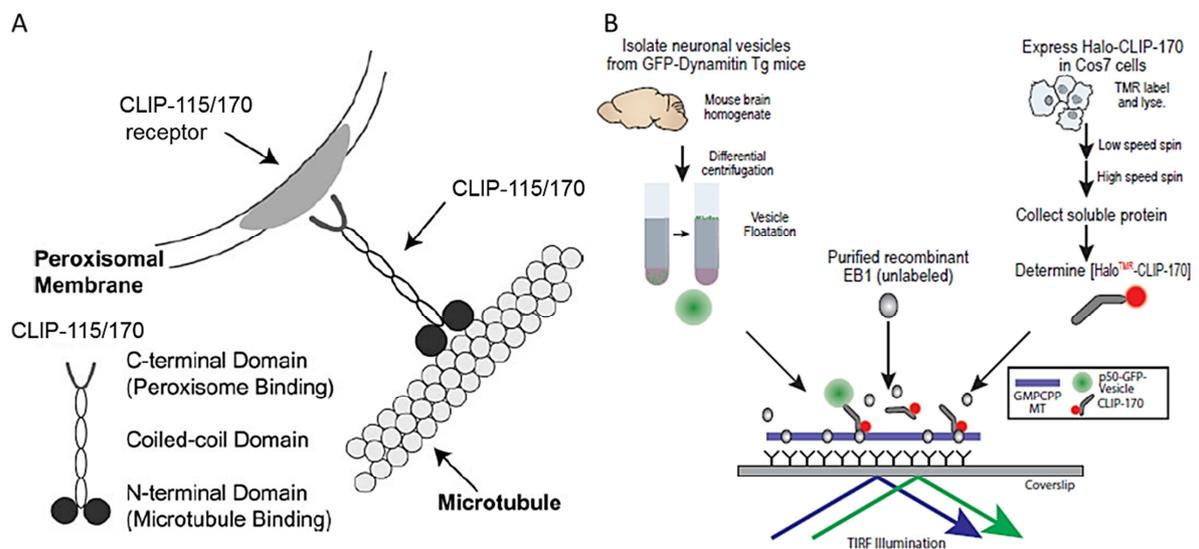


Figure 105 : Rôle des CLIPs dans la capture et le transport de vésicules. (A) Implication de CLIP-115/170 dans la liaison des peroxysomes aux microtubules (d'après **Thiemann et al., 2000**). (B) Reconstitution *in vitro* du transport des vésicules de p50-GFP dépendant d'EB1 et CLIP-170 (d'après **Nirschl et al., 2016**).

Dans les cellules HEK293, le complexe dynéine/dynactine en interagissant avec CLIP-170 assure le transport des vésicules d'EGFR (*Epidermal Growth Factor Receptor*) lors de l'endocytose. Ce transport est augmenté lorsque la Ser1384 de CLIP-170 est phosphorylée par

LRKK1. En effet, dans des cellules déplétées en LRKK1 par siRNA p150^{Glued} est décrochée des extrémités (+) des MTs, de même dans des cellules déplétées en CLIP-170 par siRNA, le transport des endosomes contenant l'EGFR est diminuée (**Kedashiro et al., 2015**).

Chez la drosophile, les mouvements du Golgi sont aussi dépendants de la dynéine cytoplasmique. Pour cela, la protéine golgienne Lva (*Lava lamp*) s'associe spécifiquement avec le complexe dynéine/dynactine cytoplasmique, D-CLIP-190 et la spectrine golgienne. Ainsi, en interagissant avec ces différents partenaires, Lva affecte la migration des membranes golgiennes en régulant le transport des membranes via la dynéine sur les MTs (**Papoulas et al., 2005**). Par ailleurs, chez la drosophile, D-CLIP-190 n'est pas indispensable au transport dépendant du complexe dynéine/dynactine des ARNm (**Dix et al., 2013**), ainsi que des lysosomes et endosomes tardifs (**Beaven et al., 2015**). Néanmoins, la délétion de D-CLIP-190 accélère le transport (**Dix et al., 2013**). Chez la levure bourgeonnante (*S. cerevisiae*), le processus de transport des cargaisons membranaires (tel que Snc1, un membre de la famille synapobrevin/VAMP des protéines v-SNARE de type R) est dépendant de Rho1 et Bik1, ainsi que de la reconnaissance de l'acide aminé aromatique en C-terminal de l' α -tubuline par Bik1 (**Boscheron et al., 2016**). Chez la levure, CLIP-170 assure également la capture et le transport du noyau. Un traitement à la rapamycine (inhibiteur de mTOR) provoque la bi-nucléation des cellules du fait de défauts dans la migration des noyaux. Ces effets de la rapamycine sont médiés par Bik1 (homologue de CLIP-170) et TOR (homologue de mTOR) (**Choi et al., 2000**). Plus précisément, la capture des extrémités (+) des MTs contenant Bik1 et la dépolymérisation peuvent fournir la force nécessaire pour transporter le noyau dans le cytoplasme (**Molk et al., 2006**). Cependant, cette fonction n'a pas été confirmée avec CLIPA chez le champignon (*A. nidulans*) (**Efimov et al., 2006**), ni chez les mammifères (**Watson and Stephens, 2006**) et la drosophiles (**Beaven et al., 2015**).

On notera que, la nécessité de p150^{Glued} pour le transport d'organites membranaires est aussi controversée (**Watson and Stephens, 2006 ; Lomakin et al., 2009**). En effet, en réponse à une blessure dans des cellules HeLa A549, la déplétion de p150^{Glued} par siRNA n'a pas d'effet sur le transport d'organites intracellulaires, telles que le RE et l'appareil de Golgi, ainsi que la mobilité de la transferrine et des endosomes précoces ou des lysosomes (**Watson and Stephens, 2006**). Lorsque CLIP-170 est déphosphorylée sur des sites contrôlant son repliement moléculaire, son affinité pour p150^{Glued} est augmentée. Cependant, dans les cellules CHO-K1, le réassemblage de l'appareil de Golgi après un traitement au nocodazole est retardé, suggérant que seule la fonction de CLIP-170 est impliquée dans l'organisation de l'appareil de Golgi (**Lee et al., 2010**).

Dans les mélanophores/mélanocytes de xénope en interphase, la présence de CLIP-170 et non p150^{Glued} à l'extrémité (+) des MTs est importante pour la capture des mélanosomes via une protéine adaptatrice et EB1 (cf. **Figure 106**). L'initiation du transport dirigé vers l'extrémité (-) de ces organites membranaires est contrôlée par la dynamique des MTs, soit la croissance des extrémités (+) décorées de CLIP-170 vers la périphérie cellulaire, ainsi que l'interaction de la dynéine avec les mélanosomes et la *lattice* des MTs (**Lomakin et al., 2009 ; cf. Figure 106**). Plus précisément, le transport rétrograde via la dynéine est régulé par des signaux intracellulaires, comme l'agrégation des mélanosomes. Ces signaux réduisent le taux d'AMPc dans le cytoplasme et donc diminue l'activité de la PKA. Cette kinase est un

régulateur négatif de la liaison de CLIP-170 aux MTs (Lee *et al.*, 2010 ; cf. page 142). Cela conduit à une augmentation du nombre d'extrémités (+) des MTs ayant une croissance persistante vers la périphérie cellulaire décorées de CLIP-170, augmentant la probabilité de capturer les mélanosomes et permettant d'accélérer leur agrégation (Lomakin *et al.*, 2011).

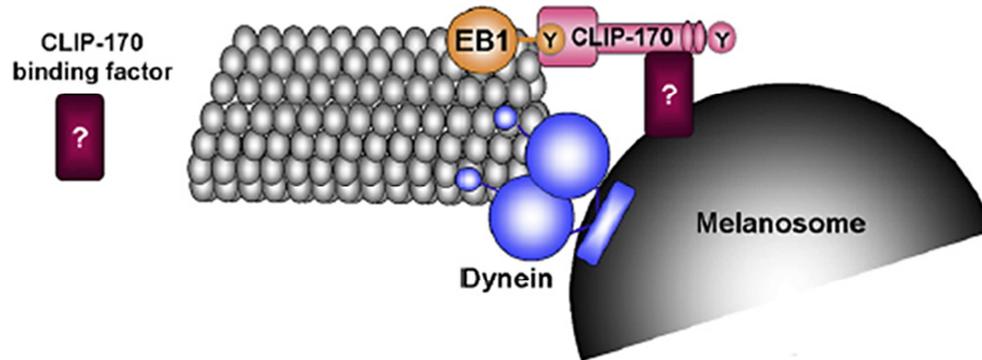


Figure 106 : Rôle de CLIP-170 dans les mélanocytes de xénope en interphase. CLIP-170 est impliquée dans la capture des mélanosomes via une protéine adaptatrice et EB1. CLIP-170 facilite le transport rétrograde par la dynéine qui interagit avec les mélanosomes et la *lattice* des MTs (Lomakin *et al.*, 2009).

En plus de son rôle en interphase, durant la mitose, CLIP-170 s'associe avec les kinétochores non-attachés aux MTs, en interagissant avec p150^{Glued} via ses motifs doigt de zinc C-terminaux (Dujardin *et al.*, 1998 ; Wittman and Desai, 2005 ; Tanenbaum *et al.*, 2006 ; Li *et al.*, 2010 ; Amin *et al.*, 2014 ; Kakeno *et al.*, 2014 ; Amin *et al.*, 2015). En plus de cette liaison à p150^{Glued} et aux kinétochores, CLIP-170 lie aussi la dynéine, la dynactine et LIS1 (Dujardin *et al.*, 1998 ; Coquelle *et al.*, 2002 ; Tai *et al.*, 2002). Dans les cellules HeLa, la voie de signalisation Plk1/CK2/CLIP-170 est essentielle pour l'attachement des MTs avec les kinétochores en localisant CLIP-170 au niveau de ces derniers, de manière dépendante du complexe dynéine/dynactine via p150^{Glued}, mais indépendante des MTs. Cette voie facilite également le transport (congression) des chromosomes (Li *et al.*, 2010). En effet, lorsque CLIP-170 est phosphorylée sur la Ser1318 par CK2 sa localisation au niveau des kinétochores, ainsi que la congression des chromosomes sont facilitées (Li *et al.*, 2010). De même, dans les cellules HeLa la voie Plk1/CLIP-170 mitotique permet l'attachement des kinétochores aux MTs, et ainsi l'alignement des chromosomes (Kakeno *et al.*, 2014 ; cf. Figure 108). Ainsi, CLIP-170 participe au mouvement des centrosomes (Tanenbaum *et al.*, 2008 ; cf. Figure 107) et des chromosomes, en s'associant aux kinétochores, via p150^{Glued} (Amin *et al.*, 2014 ; Amin *et al.*, 2015 ; cf. Figure 108-B).

Tout d'abord, concernant son rôle dans le maintien des centrosomes. Dans les cellules humaines (U2OS et HeLa) mitotiques en interagissant avec le complexe dynéine/dynactine via p150^{Glued} et LIS1, CLIP-170 assure l'assemblage correct du fuseau mitotique en limitant l'action d'Eg5, qui éloigne les centrosomes, en faisant glisser les MTs antiparallèles (cf. page 128). CLIP-170 avec la dynéine transporte les MTs mitotiques afin de rapprocher les centrosomes ensemble (Tanenbaum *et al.*, 2008 ; cf. Figure 107). En l'absence de CLIP-170 par siRNA, l'expression de CLIP-115 ne permet pas de sauver la fonction de CLIP-170 dans le rapprochement des centrosomes. En effet, comme CLIP-115 ne possède pas de motifs doigt de zinc, elle ne peut pas s'associer avec p150^{Glued} ou LIS1 pour recruter le complexe dynéine/dynactine (Tanenbaum *et al.*, 2008).

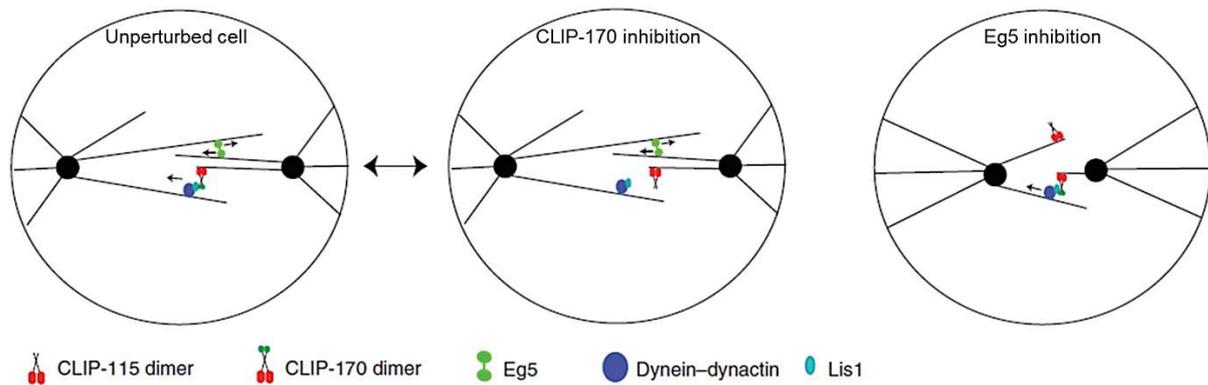


Figure 107 : Implication de CLIP-170 dans la séparation des centrosomes. En s'associant avec p150^{Glued} et LIS1 CLIP-170 dimérique (en rouge et vert) recrute le complexe dynéine/dynactine (en bleu) sur les microtubules mitotiques (en noir) et permet le rapprochement des centrosomes (en noir). Lors de l'inhibition de CLIP-170 (par siRNA), la fonction de CLIP-115 dimérique (en rouge) n'est pas redondante avec celle de CLIP-170, car elle ne peut pas recruter le complexe moteur via p150^{Glued} sur les microtubules mitotiques (**Tanenbaum et al., 2008**).

Ensuite, par rapport au mouvement des chromosomes, dans les cellules humaines, CLIP-170 s'accumule au niveau des kinétochores non-attachés aux MTs, grâce à son interaction avec p150^{Glued}, indépendamment des MTs. CLIP-170 assure l'attachement stable des kinétochores avec les MTs, ainsi que le transport (congression) et l'alignement correct des chromosomes (**Coquelle et al., 2002 ; Tanenbaum et al., 2006 ; Li et al., 2010 ; Amin et al., 2014 ; Kakeno et al., 2014 ; Amin et al., 2015 ; cf. Figure 108-B**). Cette fonction a initialement été montrée dans les cellules HeLa, en utilisant le dominant négatif de CLIP-170, c'est-à-dire en surexprimant la partie C-terminale de CLIP-170, ce qui a induit un délai de la prométaphase, dû au déplacement de la protéine endogène des kinétochores et à l'incapacité du transgène de lier les MTs et ainsi attacher les kinétochores à ces derniers (**Dujardin et al., 1998**). De même, la déplétion de CLIP-170 par siRNA dans les cellules humaines, conduit au blocage de la mitose et à des défauts dans l'alignement des chromosomes (**Wieland et al., 2004**), dû à l'échec de la fixation des kinétochores aux MTs et la congression des chromosomes (**Tanenbaum et al., 2006**).

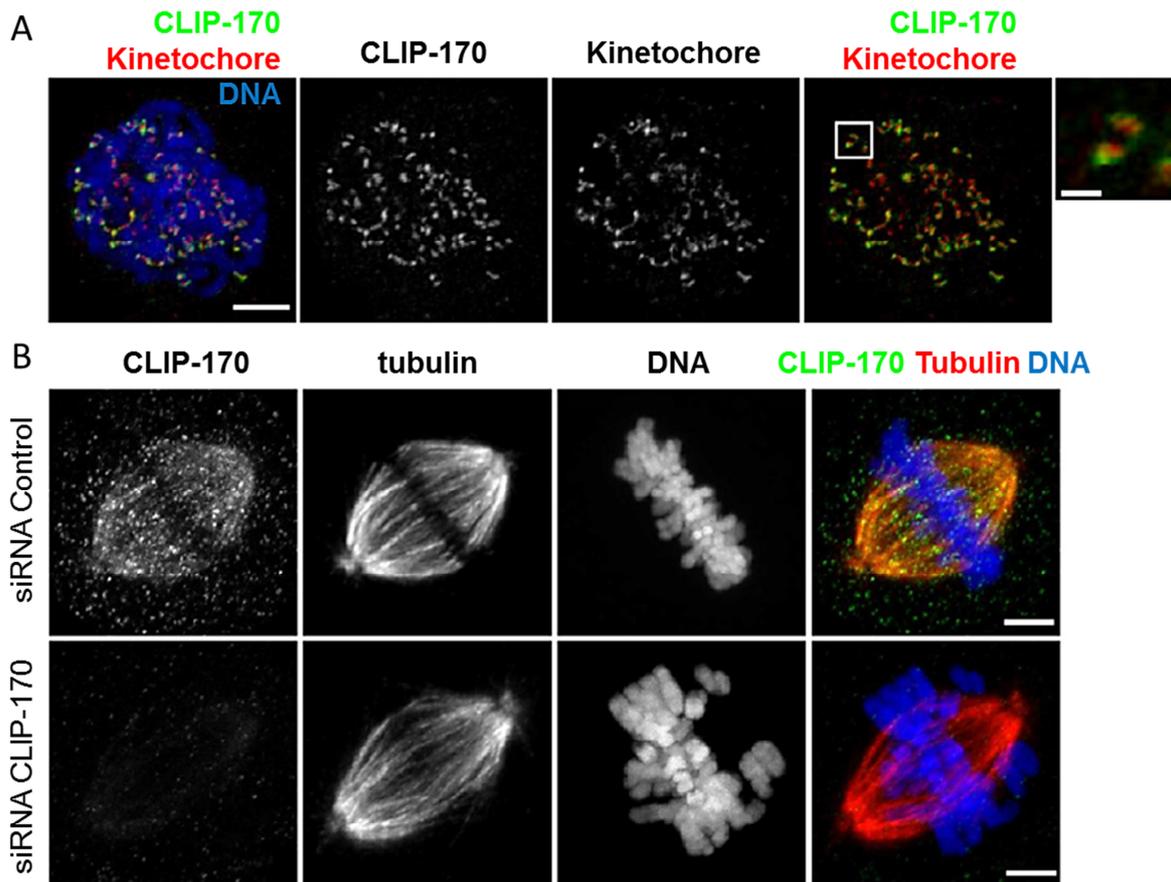


Figure 108 : Dans des cellules HeLa mitotiques, CLIP-170 participe à l'alignement des chromosomes en assurant l'attachement des MTs avec les kinétochores. (A) Après un traitement au nocodazole, CLIP-170 (en vert) co-localise avec les kinétochores (en rouge) au niveau de l'ADN (en bleu) lors de la prométaphase. Cette co-localisation est mise en évidence dans l'encadré à droite (B) Lors de la métaphase, dans des cellules transfectées avec le siRNA CLIP-170 les chromosomes ne sont pas alignés. Barres d'échelles : 5 μm et 1 μm pour le zoom (d'après **Kakeno et al., 2014**).

Une autre étude a montré que les défauts dans l'attachement des kinétochores aux MTs, ainsi que la congression et l'alignement des chromosomes dans des cellules HeLa déplétées par siRNA en CLIP-170 sont restaurés par co-déplétion de p150^{Glued} (cf. **Figure 109-A**). En effet, la localisation des kinétochores aux extrémités (+) des MTs dépend de CLIP-170 qui est recrutée par p150^{Glued}. Ces résultats suggèrent donc que CLIP-170 relie les kinétochores aux extrémités (+) des MTs contre la force médiée par la dynéine faisant glisser les kinétochores le long des MTs, facilitant *in fine* l'attachement stable des kinétochores avec les MTs (**Amin et al., 2015**). Par ailleurs, il a été montré que CLIP-170 assure l'alignement des chromosomes en recrutant Plk1 au niveau des kinétochores pendant la prométaphase, qui ce-dernier stabilise le complexe kinétochores/MTs. En effet, dans des cellules HeLa déplétées en CLIP-170 par siRNA, le recrutement de Plk1 au niveau des kinétochores est diminué et cela cause des défauts dans l'alignement des chromosomes. Les auteurs ont aussi montrés que ces deux fonctions de la voie Plk1/CLIP-170 sont régulées par la phosphorylation de la Thr287 de CLIP-170 par Cdk1 (**Amin et al., 2014** ; cf. **Figure 109-B**).

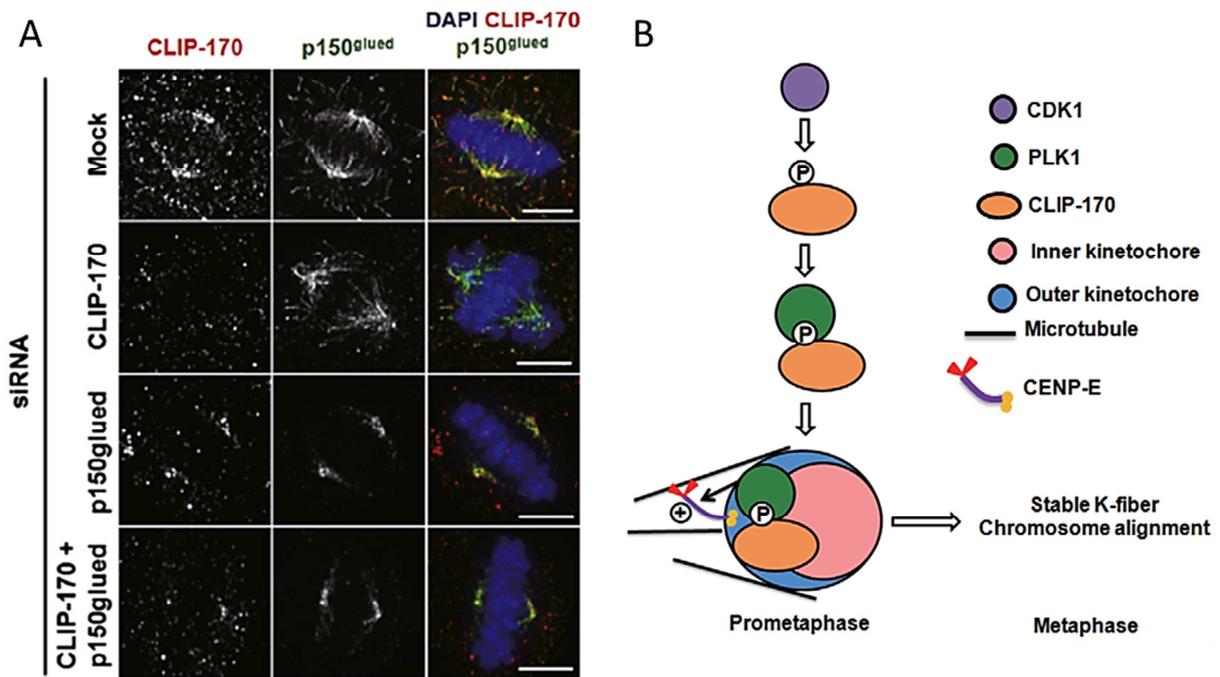


Figure 109 : Rôle de CLIP-170 dans l'alignement des chromosomes. (A) Dans les cellules HeLa la déplétion de CLIP-170 (en rouge) cause des défauts dans l'alignement des chromosomes (ADN en bleu) qui sont restaurés en co-déplétant les cellules de p150^{Glued} (en vert). Barre d'échelle : 5 μ m (d'après **Amin et al., 2015**). (B) Modèle montrant le rôle de la voie Cdk1/Plk1/CLIP-170 dans la mitose (d'après **Amin et al., 2014**).

Chez la levure, Bik1 et Tip1 sont aussi localisées au niveau des kinétochores et des MTs formant le fuseau mitotique (**Berlin et al., 1990 ; Brunner and Nurse, 2000**). Chez *S. pombe*, Tip1/CLIP-170 est directement ou indirectement nécessaire pour le mouvement des chromosomes, mais indépendamment de Mal3/EB1 (**Golstone et al., 2010**).

CLIP-170 est aussi impliquée dans la formation des lamellipodes et la migration cellulaire (**Suzuki and Takahashi, 2008**). Dans les fibroblastes, la guidance et la capture des MTs au niveau des adhérences focales est assurée par la polymérisation et l'association de CLIP-170 aux extrémités des MTs allant vers la périphérie. Les auteurs montrent également qu'au niveau des adhérences focales le couplage entre les MTs et l'actine est assuré par un complexe protéine (**Krylyshkina et al., 2003**) dans lequel IQGAP1 peut être retrouvé (**Noordstra and Akhmanova, 2017**). En effet, il a été montré que le complexe IQGAP1/CLIP-170, en aval de Rac1 et Cdc42 semble avoir un rôle dans l'attachement des extrémités (+) des MTs avec le réseau cortical d'actine, conduisant à la polarisation cellulaire (**Fukata et al., 2002**). Une autre étude a montré que dans les cellules MDA-MB231, CLIP-170 empêche la formation des lamellipodes et la migration cellulaire induite par des stimuli extracellulaires, en séquestrant IQGAP1, Rac1 et la chaîne lourde de la kinésine (**Suzuki and Takahashi, 2008**).

Par ailleurs, la voie de signalisation AMPK/CLIP-170 est impliquée dans la régulation positive de la polarité et la migration cellulaire, en diminuant la taille des adhésions focales et la formation des lamellipodes (**Nakano et al., 2010**). Il a également été montré que dans les cellules de mammifères en culture et les embryons de poissons zèbres, l'activation de CLIP-170 par le pregnenolone (cf. **page 142**) augmente l'assemblage des MTs et la migration cellulaire (**Weng et al., 2013**). Dans les jonctions cellulaires des cellules MCF7, la dynamique

des MTs est importante pour permettre la concentration d'E-cadhérine. Plus précisément, CLIP-170 localisée aux bouts (+) des MTs dynamiques, se prolonge dans les jonctions cellulaires composées d'E-cadhérine. CLIP-170 favorise l'accumulation locale de la E-cadhérine dans les jonctions cellulaires (Stehbens *et al.*, 2006 ; cf. **Figure 110**).

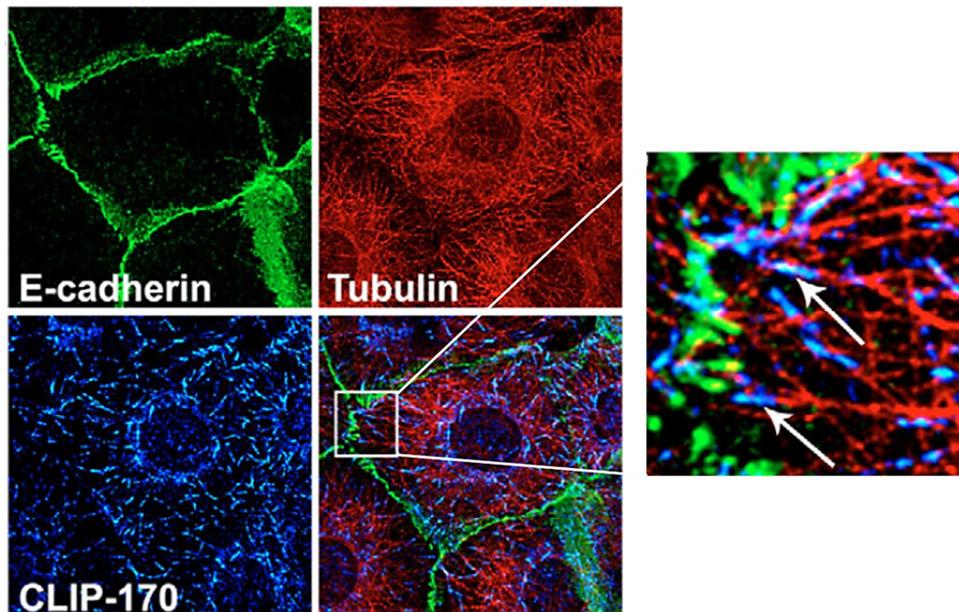


Figure 110 : Fonction de CLIP-170 dans les jonctions cellulaires composées d'E-cadhérine. Dans les cellules MCF7, CLIP-170 (en bleu) est localisée aux extrémités (+) (flèches blanches) des microtubules (en rouge). CLIP-170 est retrouvé au niveau des jonctions cellulaires d'E-cadhérine (en vert) grâce au prolongement radial des microtubules. CLIP-170 assure l'accumulation locale d'E-cadhérine au niveau des jonctions cellulaires (d'après Stehbens *et al.*, 2006).

Une autre étude a montré que dans les cellules épithéliales (MDCK, ARPE19 et TC7) les extrémités (+) des MTs ciblent les jonctions adhérentes et se positionnent près de la cadhérine. De plus, p150^{Glued} co-localise avec la nineine, indiquant que le complexe dynéine/dynactine est retrouvé au niveau des jonctions cellulaires. Les auteurs ont également montré qu'à la périphérie cellulaire CLIP-170 et EB1 co-localisent avec la β -caténine et la dynéine cortical, assurant la capture des extrémités (+) des MTs au niveau des jonctions cellulaires, qui est une étape intermédiaire dans l'établissement de la polarité apico-basale des cellules (Bellett *et al.*, 2009).

Dans les macrophages (RAW 264,7) activés par le LPS(Lipopolysaccharide)/IFN γ (Interféron- γ), CLIP-170 a aussi un rôle majeur dans la diffusion cellulaire et la phagocytose, en régulant la stabilité microtubulaire (Binker *et al.*, 2007). En effet, dans ces cellules, les MTs sont plus acétylés, et CLIP-170 ne s'accumule plus aux bouts (+) des MTs, mais tout le long de ces derniers. L'activation par le LPS/IFN γ (ou l'inhibition de la phosphatase 2A par l'acide okadaïque), conduit à une augmentation de la diffusion cellulaire et de la phagocytose, qui est reversée en présence de la construction dominante négative (CLIP-170 Δ Head) (Binker *et al.*, 2007). Lors de la phagocytose, CLIP-170 peut contrôler la polymérisation de l'actine en interagissant directement avec le domaine FH2 de la formin mDia1 (cf. **Annexe I**), qui est une protéine de nucléation de l'actine, dans des macrophages. Cette réorganisation de l'actine est essentiel pour le processus de

phagocytose et CLIP-170, mDia1/formin sont impliquées dans la formation de vésicules phagocytiques (Lewkowicz *et al.*, 2008 ; cf. Figure 111).

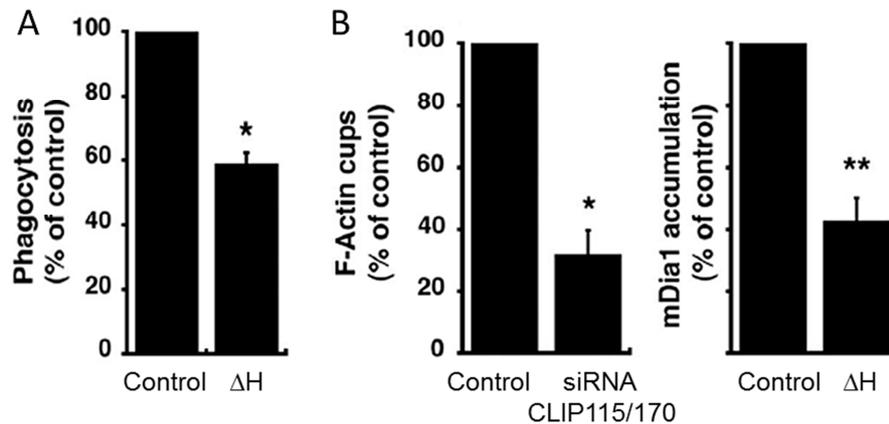


Figure 111 : Rôle de CLIP-170 dans la phagocytose. (A) Le dominant négatif de CLIP-170 (ΔH) inhibe la phagocytose. (B) La fonction de CLIP-170 est importante pour la polymérisation de l'actine (à gauche) et le recrutement de mDia1 (à droite). L'inhibition de CLIP-170 est réalisée en transfectant les macrophages RAW264,7 avec pEGF-CLIP-170 ΔH , ou des siRNA CLIP-115/170. Le contrôle correspond à des macrophages RAW264,7 transfectés avec pEGF. Représentation de la moyenne \pm SEM de trois expériences indépendantes, * $p < 0,001$; ** $p < 0,005$ (d'après Lewkowicz *et al.*, 2008).

Préalablement, chez la drosophile, dans les neurones, D-CLIP-190 a été retrouvée associée à une myosine conventionnelle de type VI (la myosine 95F), suggérant qu'elle puisse relier les réseaux d'actine et de MTs (Lanz and Miller, 1998). De même, dans les cônes de croissance des axones, la localisation de CLIP-170 et D-CLIP-190 dépend de la myosine VI et des filaments d'actine (Beaven *et al.*, 2015). Plus récemment, dans les neurones ce lien indirect entre l'actine et les MTs via CLIP-170, a été montré. En effet, CLIP-170 depuis l'extrémité (+) des MTs, interagit avec la formin mDia via le motif FEED-like dans le domaine *coiled-coil* de CLIP-170 et accélère l'assemblage des filaments d'actine (cf. Figure 112). Cette interaction est nécessaire pour que le branchement dendritique soit correct dans les neurones primaires (Henty-Ridilla *et al.*, 2016).

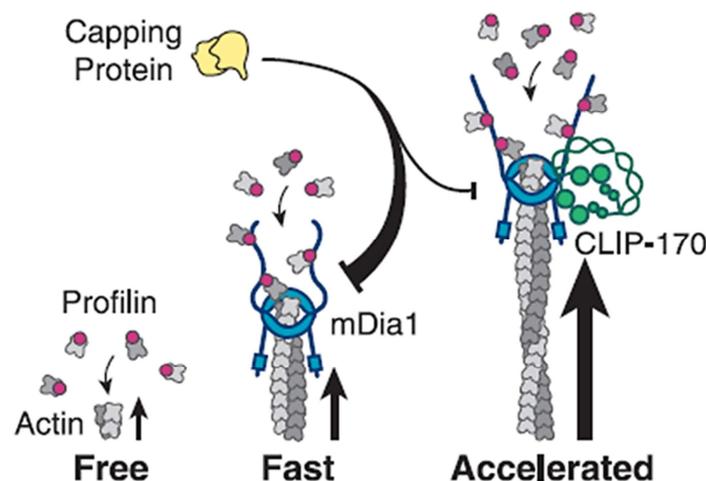


Figure 112 : Implication de CLIP-170 dans l'assemblage des filaments d'actine en interagissant avec mDia1/formin, dans les neurones. L'interaction entre mDia1/formin et CLIP-170 via son motif FEED-like augmente la polymérisation des filaments d'actine (Henty-Ridilla *et al.*, 2016).

Dans des kystes polarisés de cellules MDCKII (*Madin-Darby Canine Kidney II*), CLIP-170 s'accumule au cortex apical, où se trouvent les nMTOCs (*non-centrosomale Microtubule Organizing Centers*), contenant la nineine. CLIP-170 est d'ailleurs nécessaire à l'accumulation de cette nineine au nMTOC où elle permet l'ancrage des extrémités (-) des MTs. En effet, lors de la déplétion par siRNA des cellules en CLIP-170, cela induit la perte de la relocalisation de la nineine aux nMTOCs dans les jonctions adhérentes et une diminution de la taille des kystes polarisées. On notera que toutefois la polarité apico-basale est conservée en absence de CLIP-170, suggérant la présence d'autres mécanismes compensateurs (Goldspink *et al.*, 2017 ; cf. Figure 113).

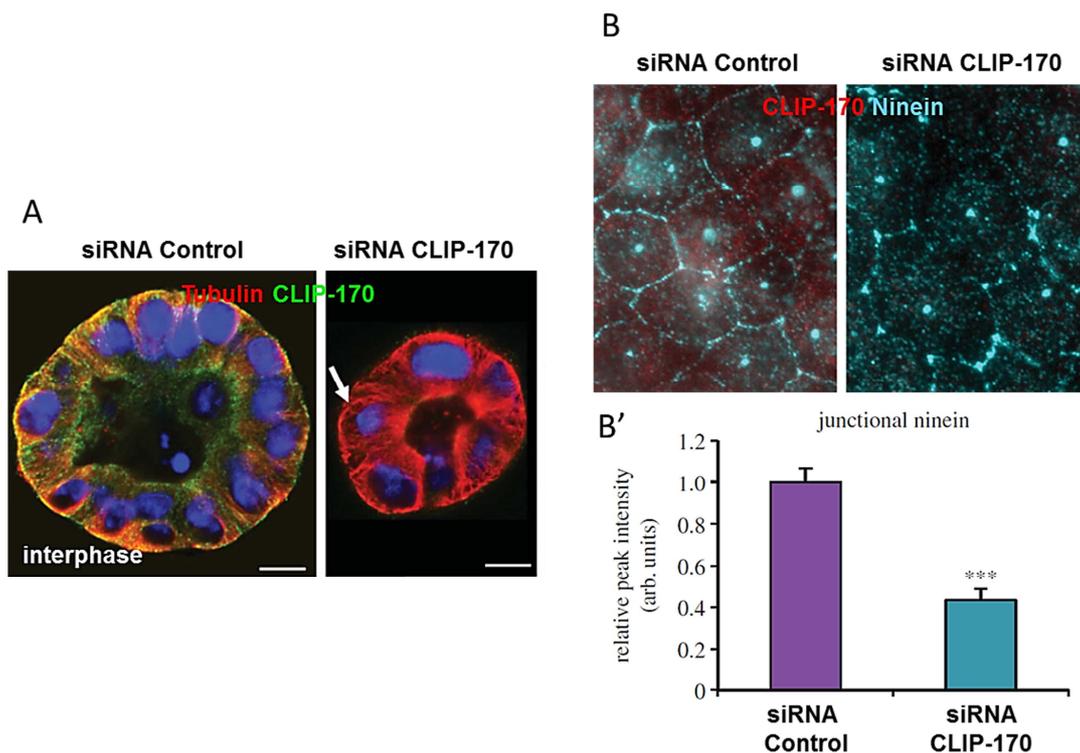


Figure 113 : Rôle de CLIP-170 dans le recrutement de la nineine corticale dans des cellules MDCKII. (A) Localisation de CLIP-170 (en vert) et des microtubules (en rouge) au niveau du cortex apical dans des kystes polarisés de cellules MDCKII déplétées ou non en CLIP-170. Les kystes traités avec le siRNA CLIP-170 ont une plus petite taille et moins de microtubules (flèche blanche). (B) Immunofluorescence de cellules MDCKII déplétées ou non en CLIP-170 permettant d'observer la nineine corticale (en bleu) et CLIP-170 (en rouge). (B') Dans les cellules traitées avec le siRNA CLIP-170 l'intensité de la nineine corticale est réduite. Barres d'échelle : 10 μ m (d'après Goldspink *et al.*, 2017).

Dans les neurones, l'entrée de Ca^{2+} augmente la migration neuronale via l'interaction de LIS1 avec un complexe multi-protéique péri-membranaire, impliquant Cdc42, IQGAP1 et CLIP-170. Ce dernier est impliqué dans la régulation du cytosquelette en augmentant la polymérisation de l'actine et en favorisant l'attachement des extrémités des MTs à la F-actine corticale (Kholmanskikh *et al.*, 2006). Chez les mammifères, CLIP-170 participe également au maintien de la morphologie et augmente la croissance des prolongements dendritiques (Swiech *et al.*, 2011). Dans des neurones KO pour *Clip1* et *Clip2*, la mutation des CLIPs affecte la vitesse ainsi que la longueur de polymérisation, mais pas la durée de polymérisation des MTs. Ainsi, les CLIPs influencent le ratio MT/tubuline (Stepanova *et al.*, 2010). Une

autre étude a montré que les protéines CLIP-115 et CLIP-170 assurent la formation de l'axone, en régulant la polarisation neuronale. En effet, via leur action sur la dynamique, elles favorisent la polymérisation des MTs, sans altérer le cytosquelette d'actine, dans les cônes de croissance, où elles sont enrichies (**Neukirchen and Bradke, 2011**).

Le KO de CLIP-170 engendre des problèmes de spermatogénèse dans les souris (**Akhmanova et al., 2005**), ainsi que chez l'homme, avec en plus un déficit cognitif (**Larti et al., 2015**).

Chez la drosophile, l'expression de D-CLIP-190 est augmentée lors du développement du système nerveux et dans les neurones (**Lantz and Miller, 1998**). Cependant, D-CLIP-190 n'est pas une +TIP dans ces cellules et elle n'a pas un rôle important dans la régulation de la croissance des axones. Néanmoins, la délétion de D-CLIP-190 accélère le transport axonal (**Beaven et al., 2015**).

F3 – Implication des CLIPs dans des maladies

Plusieurs études ont montré que CLIP-170 était impliquée dans le cancer. Effectivement, la CLIP-170/restine est surexprimée dans le lymphome de Hodgkin et le lymphome anaplasique à grandes cellules (**Delabie et al., 1992 ; Bilbe et al., 1992 ; Delabie et al., 1993**). La surexpression de cette protéine dans les cellules Reed-Sternberg du lymphome, augmente la croissance cellulaire en augmentant l'expression du récepteur de la transferrine à la surface des cellules (**Delabie et al., 1993**).

Dans les cellules de mammifères, CLIP-170 favorise la cancérogénèse en régulant l'angiogénèse (**Sun et al., 2013**), ou encore la néo-vascularisation (**Xie et al., 2014**). Plus précisément, l'inhibition de CLIP-170 par siRNA conduit à la diminution de la croissance tumorale, en diminuant la vascularisation tumorale des cellules MDA-MB-231 injectées chez la souris *nude* (**Sun et al., 2014 ; cf. Figure 114-A**). Dans les cellules HUVEC (*Human Umbilical Vein Endothelial Cells*), CLIP-170 est requise pour la migration des cellules endothéliales, via son action sur la polarité cellulaire (**Xie et al., 2014 ; cf. Figure 114-B**). Ainsi, en réponse à des signaux angiogéniques libérés des cellules tumorales, dans les cellules endothéliales CLIP-170 favorise la capture et la stabilisation des MTs et stimule la polarisation et la migration pour la formation et la croissance des vaisseaux sanguins (**Xie et al., 2014**).

Cependant, le rôle de CLIP-170 dans la migration est controversé. En effet, dans des cellules cancéreuses invasives du sein (les MDA-MB-231), CLIP-170 est fortement exprimée, mais aurait un effet protecteur, en empêchant la formation des lamellipodes et donc l'invasion cellulaire (**Suzuki and Takahashi, 2008**).

Enfin, CLIP-170 joue le rôle de protéine d'échafaudage pour faciliter l'action d'HDAC6 dans la régulation de la mobilité des cellules pancréatiques cancéreuses. Dans ces cellules l'expression d'HDAC6 est élevée, tant au niveau protéique, qu'ARNm et leur mobilité est stimulée lorsque HDAC6 interagit avec CLIP-170 (**Li et al., 2014**).

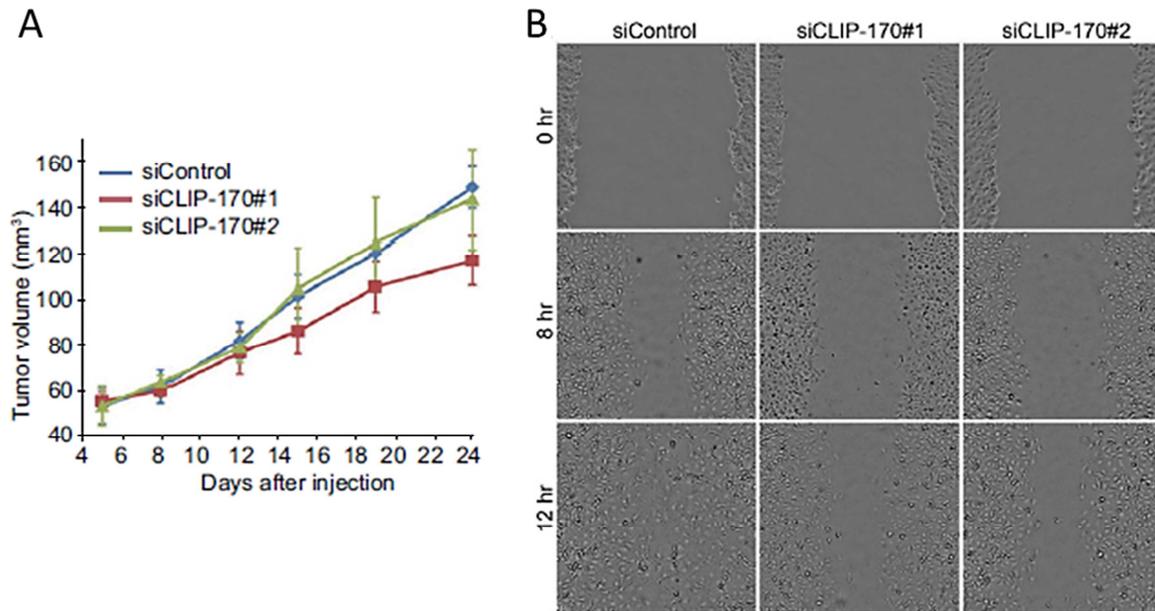


Figure 114 : Rôle de CLIP-170 dans la cancérogénèse. (A) Observation de la croissance tumorale des cellules MDA-MB-231 injectées sous la peau de souris *nude*. La croissance tumorale des cellules transfectées avec le siRNA CLIP-170#1 est diminuée par rapport aux cellules transfectées avec le siRNA Control (d'après **Sun et al., 2013**). (B) CLIP-170 joue un rôle majeur dans la migration des cellules HUVEC après une blessure. Les cellules transfectées avec les siRNA CLIP-170#1 ou #2 migrent moins que les cellules transfectées avec le siRNA Control (d'après **Xie et al., 2014**).

Concernant le traitement des cancers, plusieurs études mettent en avant le fait que la sensibilité des cellules cancéreuses au paclitaxel peut être modulée par des protéines se liant aux MTs (**Alli et al., 2002 ; Bhat and Setaluri, 2007 ; Wang et al., 2009**). C'est aussi le cas pour CLIP-170, qui a été décrit comme un médiateur de la sensibilité du paclitaxel dans le cancer du sein. Effectivement, dans cette étude, les auteurs ont montré que l'expression de CLIP-170 corrèle avec la sensibilité au paclitaxel, aussi bien dans des lignées cellulaires du cancer du sein, que dans des échantillons cliniques. En effet, CLIP-170 augmente la capacité du Taxol® à bloquer la progression du cycle cellulaire et à induire l'apoptose, en augmentant l'affinité de ce stabilisateur des MTs pour sa cible (**Sun et al., 2012**). Cependant cette notion est controversée car dans les cellules MDA-MB-231, CLIP-170 participe également au mécanisme de résistance au paclitaxel (Taxol®). En effet, dans ces cellules, la résistance au paclitaxel (Taxol®) est induite par une forte expression de SEPT9_i1, ainsi que des modifications post-traductionnelles (polyglutamylation et retyrosination) de la tubuline. Ces modifications conduisent à un recrutement accru de CLIP-170 et MCAK sur les MTs. Dans ces cellules, la sensibilité au paclitaxel (Taxol®) est restaurée, en inhibant par siRNA la retyrosination et la polyglutamylation des MTs, ainsi que l'expression des septines, CLIP-170 et MCAK (**Froidevaux-Klipfel et al., 2015**).

Les patients ayant un lymphome de Hodgkin sont de base soignés par la radiothérapie seule ou combinée à la chimiothérapie utilisant des agents antimétaboliques, comme les vincalcalcoïdes (cf. **page 70**). Cette première ligne de traitement permet de traiter environ 80% des patients (**Michot et al., 2017**). Néanmoins, ces traitements provoquent des effets secondaires à long terme pour les patients, comme des maladies cardiovasculaires, des maladies pulmonaires et des tumeurs malignes secondaires. L'immunothérapie est actuellement

envisagée comme une nouvelle option thérapeutique (Michot *et al.*, 2017). Ainsi, le traitement Brentuximab Vedotin ADC (*Antibody Drug Conjugate*) contient un anticorps ciblant le CD30 exprimé par les cellules de Reed-Sternberg du lymphome et un agent anti-mitotique, le MMAE (*MonoMethyl Auristatin E* ; cf. **Figure 115**). Les patients traités ainsi, ont une meilleure rémission complète après la transplantation de cellules souches (Currin and Gopal, 2012 ; Sureda *et al.*, 2014).

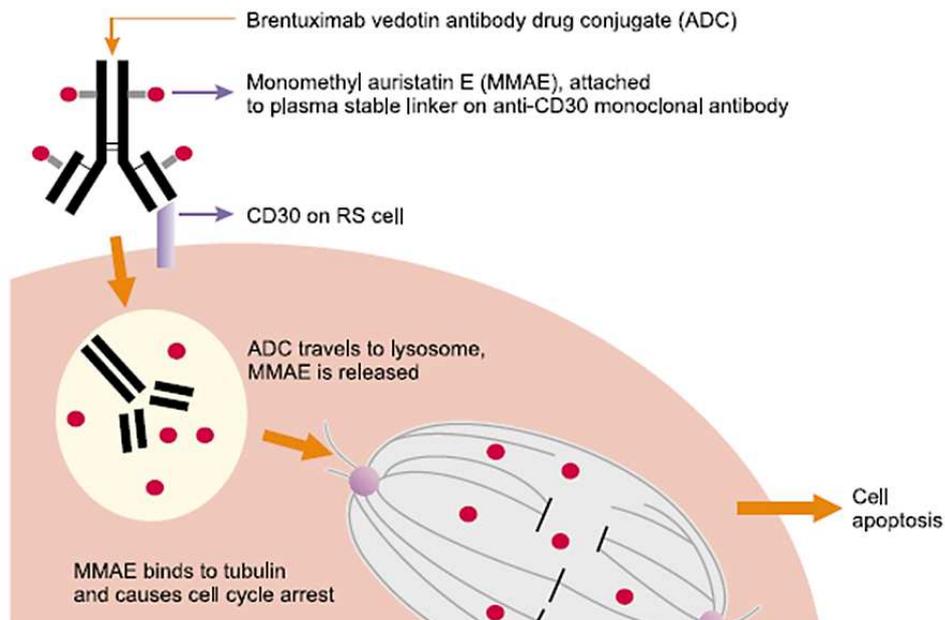


Figure 115 : Mécanisme proposé pour l'action du Brentuximab Vedotin dans les cellules Reed-Sternberg dans le lymphome de Hodgkin. Cet anticorps (en noir) se lie au CD30 (en violet) à la surface des cellules de Reed-Sternberg (RS, en rose) et est internalisé. Dans le lysosome (en jaune clair), l'agent anti-microtubulaire, MMAE (en rouge) conjugué au Brentuximab Vedotin est libéré, conduisant à l'arrêt du cycle cellulaire et l'apoptose en se liant à la tubuline (Currin and Gopal, 2012).

CLIP-115 a aussi été proposée comme impliquée dans le syndrome de Williams, caractérisé par différents phénotypes, tels qu'une dysmorphie du visage, des problèmes cardiovasculaires du fait d'une sténose aortique, un retard de croissance, un déficit cognitif, des troubles du comportement et de la coordination motrice. Chez 95% des patients, ce syndrome est causé par la délétion hétérozygote d'une région chromosomique (locus 7q11.23) de 1,6 Mb, aussi appelée WSCR (*Williams Syndrome Critical Region*). Cette région contient 20 gènes, dont les gènes *CLIP2/CYLN2* et *LIMK1*, qui code une kinase cytoplasmique impliquée dans la régulation du cytosquelette d'actine et des MTs (Hoogenraad *et al.*, 2004 ; Vandeweyer *et al.*, 2012 ; cf. **Figure 116**). Initialement, il a été montré que la délétion de *CYLN2*, chez la souris est à l'origine de certains phénotypes du syndrome de Williams, comme le retard de croissance, les problèmes de mémorisation et les défauts dans la coordination motrice (Hoogenraad *et al.*, 2002). Comme des souris KO pour CLIP-115 et LIMK1 présentent des défauts neurologiques et comportementaux apparentés au syndrome de Williams, il a été proposé que des défauts du cytosquelette causés par la perte de ces deux gènes seraient responsable des symptômes neurologiques chez les patients atteints du syndrome de Williams (Hoogenraad *et al.*, 2004). Cependant, des souris KO pour *CYLN2* et *GTF2IRD1* (un facteur de transcription) ont été générées, présentant une réduction de la taille

du corps calleux et des déficits dans la coordination motrice. Ceci suggère que LIMK1 ne serait pas responsable du syndrome humain. D'ailleurs, des patients ayant les gènes *STX1A* et *LIMK1* délétés ont montré des fonctions cognitives et motrices significativement meilleures que dans le syndrome de Williams, suggérant que ces gènes ne sont pas impliqués dans la pathologie (van Hagen *et al.*, 2007). Enfin, récemment, il a été montré que chez l'homme l'haplo-insuffisance de *CLIP2* n'a pas, à elle seule, de conséquence clinique apparente, supportant le rôle d'autres gènes (*GTF2I* et *GTF2IRD1*) dans les aspects cognitifs et spatio-visuels de la pathologie. Ainsi, le rôle de *CLIP2* dans le syndrome de Williams ne serait que minime, probablement en interagissant avec un autre gène de la dététion WSCR (Vandeweyer *et al.*, 2012).

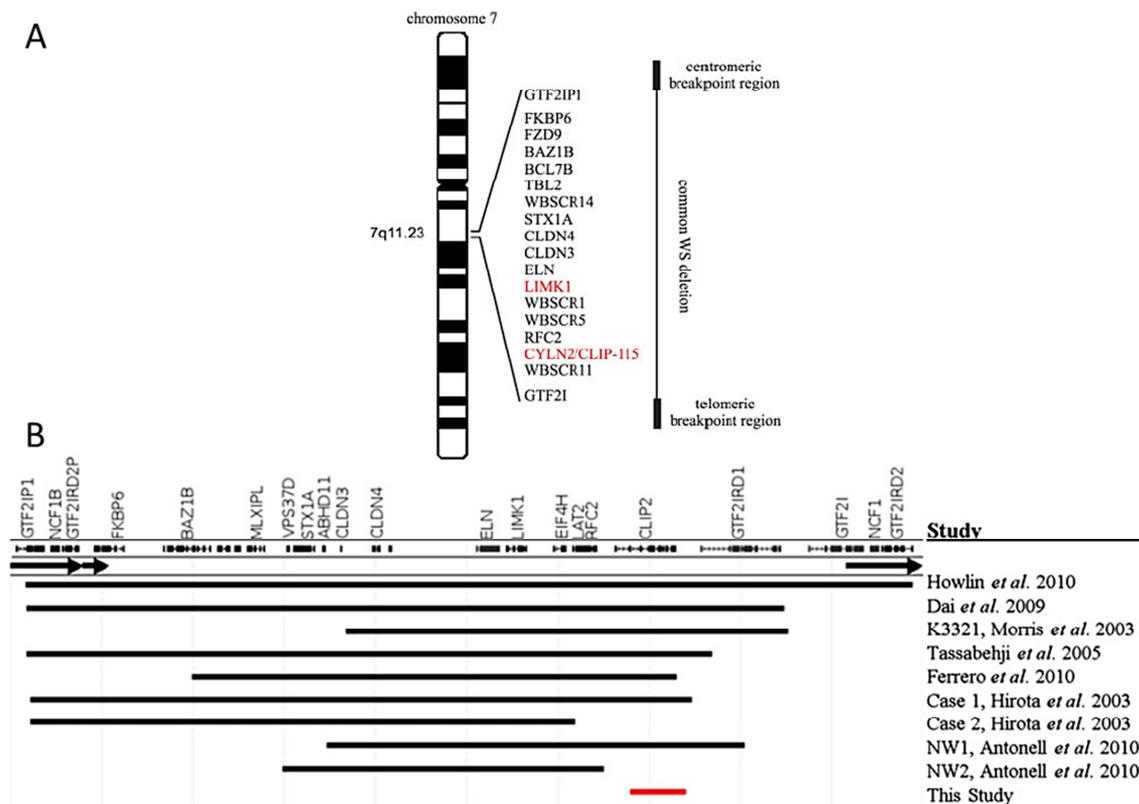


Figure 116 : Représentation de la *Williams Syndrome Critical Region* (WSCR). (A) Région chromosomique (locus 7q11.23) contenant une vingtaine de gènes, dont *LIMK1* (*LIM Kinase 1*) et *CYLN2/CLIP-115* (*Cytoplasmic Linker Protein 115*) (en rouge) (Hoogenraad *et al.*, 2004). (B) Délétions de gènes dans la WSCR à l'origine de phénotypes du syndrome de Williams. Le trait rouge met en évidence la délétion hétérozygote de *CLIP2*, qui ne donne pas de symptôme de la pathologie (d'après Vandeweyer *et al.*, 2012).

Il est connu que les particules virales utilisent la dynéine et les kinésines afin de se mouvoir dans la cellule le long des MTs (cf. page 66). En revanche, l'entrée et l'initiation du transport des virus dans les cellules sont moins bien décrits. Dans ce contexte, pour la première fois, CLIP-170 a été montrée comme nécessaire dans la capture des particules virales du virus de l'herpès, HSV1 (*Herpes Simplex Virus type 1*), afin d'initier leur transport rétrograde et l'infection dans les cellules humaines. Plus précisément, les auteurs ont montré que les particules du virus entrent dans les cellules en utilisant un complexe dynamique, localisé au niveau des extrémités (+) des MTs, constitué d'EB1, de CLIP-170 et de la dynactine-1 (Jovasevic *et al.*, 2015 ; cf. Figure 104).

Troisième partie : la famille des Mitogen-Activated Protein Kinases (MAPKs)

Dans les cellules, face à des stimuli environnementaux ou intracellulaires, la dynamique et les activités des MTs peuvent être modulées par des voies de signalisation. La voie des MAPKs (*Mitogen-Activated Proteins Kinases*) en fait partie.

La voie des MAPKs est impliquée dans de nombreux processus biologiques et sa dérégulation contribue à des pathologies humaines. Son intérêt en tant que cible thérapeutique fait qu'il est important de continuer à étudier cette voie de signalisation, en physiopathologie (Kim and Choi, 2015 ; Zeke *et al.*, 2016).

I – La voie des Mitogen-Activated Protein Kinases (MAPKs)

De par la diversité de leurs substrats, les MAPKs sont impliquées dans diverses activités cellulaires, telles que la prolifération, la différenciation, la division, la migration, l'inflammation, la réponse immunitaire ainsi que l'immunité innée, la survie cellulaire ou l'apoptose, ou encore l'autophagie (Kim and Choi, 2015 ; Zeke *et al.*, 2016).

Toutes les MAPKs (*MAP Kinases*) sont des Ser/Thr kinases. Elles appartiennent au groupe GMGC de kinases, regroupant notamment les CDKs (*Cyclin-Dependent Kinases*), GSK3 et les CDKs (*CDK-like kinases*) (Zeke *et al.*, 2016).

Chez les mammifères, les MAPKs sont organisées en trois familles, les ERKs, et les kinases de stress p38 et JNKs (cf. **Tableau 10** et **Figures 117** et **118**). Les kinases ERKs sont principalement activées par des signaux de différenciation, tandis que les MAPKs p38 et JNK sont activées par des stress et sont collectivement appelées SAPKs (*Stress-Activated Kinases*) (Sabio and Davis, 2014).

Famille de MAPKs	Membres	Autres noms
ERKs	ERK1, ERK2, ERK3, ERK4, ERK5, ERK6, ERK7 et ERK8	MAPK2, p40, p41, p41mapk, p42mapk, p44mapk...
p38	Isoformes α , β , γ et δ	SAPK2, RK, mHOG1, CSBP
JNKs	JNK1, JNK2 et JNK3	SAPK1/2/3, MAPK8/9/10, JNK1/2/3 α - ou β -1/2, p46, p54...

Tableau 10 : Classification et nomenclature des MAPK (d'après Cargnello and Roux, 2011 ; Coffey, 2014, Zeke *et al.*, 2016).

La voie des MAPKs est ubiquitaire et extrêmement conservée chez les eucaryotes. Les sérine/thréonine kinases cytoplasmiques intégrées dans ce réseau répondent à différents récepteurs, comme les récepteurs à activité tyrosine kinase, les récepteurs des cytokines, les

récepteurs couplés aux protéines G et les récepteurs des cellules T (TCR) et des cellules B (Khorasanizadeh *et al.*, 2017 ; cf. Figure 117). Elle est décrite comme un système majeur de la réponse cellulaire au stress chez les eucaryotes (Jiang *et al.*, 1996 ; Hotamisligil and Davis, 2016). Les MAPKs sont activées, via une cascade de phosphorylation en réponse à des stress environnementaux. Ces dernières coordonnent la réponse cellulaire et transmettent les signaux jusqu'au noyau, via différents effecteurs (Khorasanizadeh *et al.*, 2017 ; cf. Figure 117).

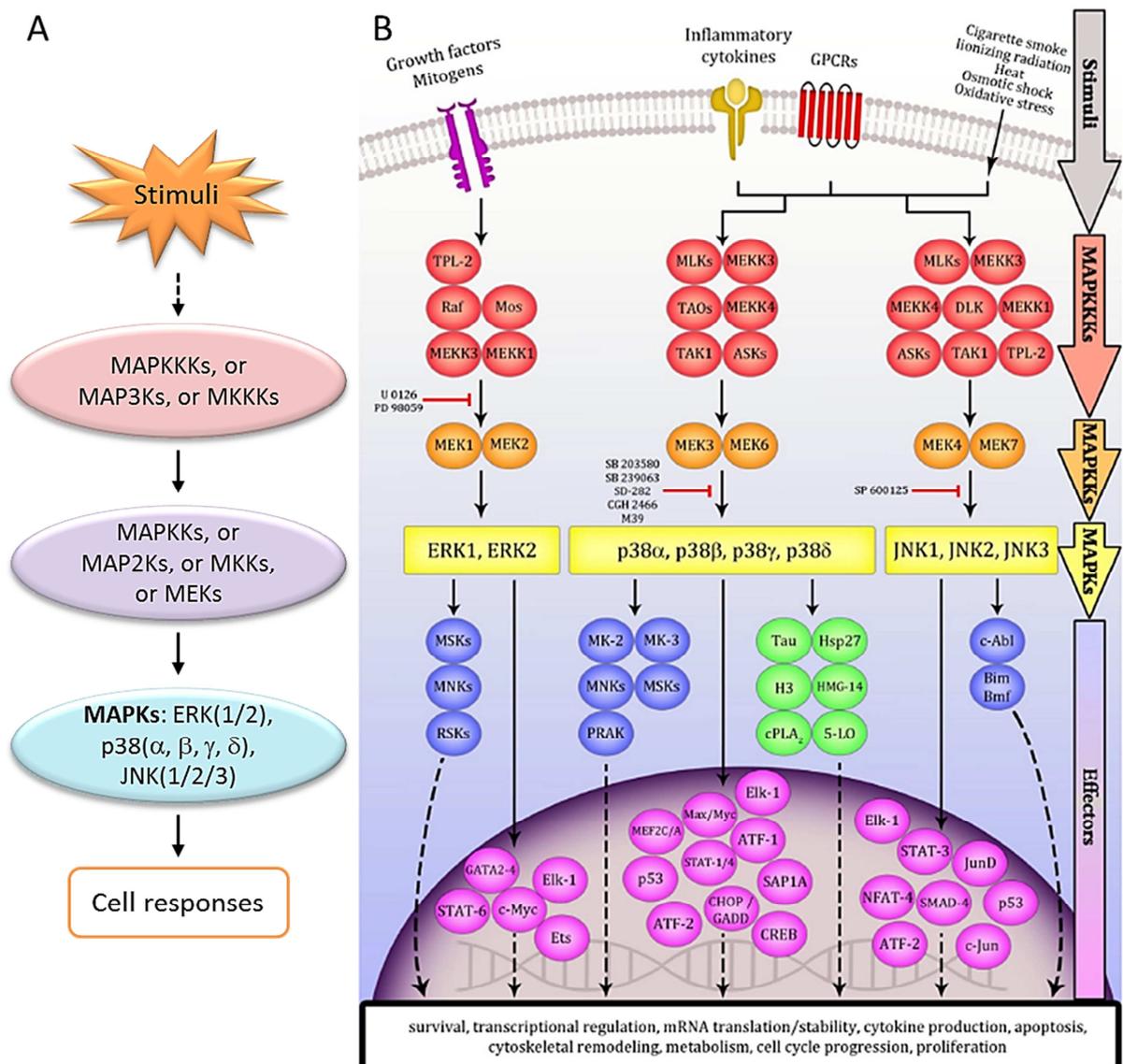


Figure 117 : Voie de signalisation des MAPKs. (A) Représentation générale de la cascade des kinases conduisant à l'activation des MAPKs en réponse à des stimuli, dans le but d'induire des réponses cellulaires (d'après Cargnello and Roux, 2011 ; Kim and Choi, 2015 ; Khorasanizadeh *et al.*, 2017). (B) Processus cellulaires en réponse à des signaux de stress, régulés par la cascade des trois familles de MAP kinases et leur effecteurs (Khorasanizadeh *et al.*, 2017).

Afin que les MAPKs (ERK, p38 et JNK) phosphorylent leurs substrats, il faut qu'elles soient activées. Dans le cytoplasme, les MAPKs sont activées par une double phosphorylation sur une thréonine et une tyrosine dans leur boucle d'activation (Thr-X-Tyr) dans le domaine kinase (cf. Figure 118). Leur activation, résulte d'une cascade de phosphorylations faisant

intervenir les MAPKKKs (*MAP Kinase Kinase Kinases*), aussi appelées MAP3Ks ou MKKKs, puis les MAPKKs (*MAP Kinase Kinases*), aussi appelées MAP2Ks, MKKs (*MAPK Kinases*), ou MEKs (*MAPK/ERK Kinases*). Au départ de la cascade, les MAPKKKs sont activées par une variété de récepteurs et de stimuli cellulaires. Une fois les MAPKs activées, elles pourront agir au niveau du cytoplasme et provoquer la translocation nucléaire de facteurs de transcription (leurs substrats) pour y réguler l'expression de nombreux gènes (**Khorasanizadeh et al., 2017** ; cf. **Figure 117**).

Les MAPKs dites conventionnelles incluent les ERK 1/2 (*Extracellular signal-Regulated Kinases 1/2*), aussi appelées les MAPKs p42/44, les MAPKs p38 (α , β , γ et δ), et les JNKs 1/2/3 (*c-Jun NH₂-terminal Kinases 1/2/3*) (**Davis, 1993** ; **Cargnello and Roux, 2011** ; **Kim and Choi, 2015** ; **Khorasanizadeh et al., 2017** ; cf. **Figure 118**). Toutes les MAPKs conventionnelles contiennent un domaine Ser/Thr kinase bordé des régions N- et C-terminales de différentes longueurs (**Cargnello and Roux, 2011** ; cf. **Figure 118**). Durant ce travail, nous nous sommes plus particulièrement intéressés aux JNKs.

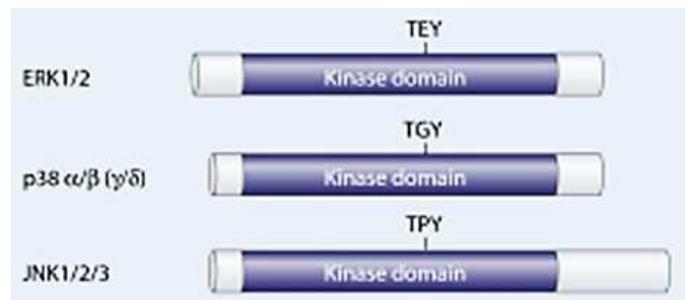


Figure 118 : Représentation de la structure générale des MAPKs conventionnelles (d'après **Cargnello and Roux, 2011**).

A – La voie de signalisation cellulaire incluant les ERKs

La famille des ERKs (*Extracellular signal-Regulated Kinases*) est constituée de huit protéines homologues (ERK1, ERK2, ERK3, ERK4, ERK5, ERK6, ERK7, ERK8), tandis que les MAPKs conventionnels ERK, contiennent deux à trois membres (ERK1/2 et 5). Les deux protéines les plus étudiées et pour lesquelles leur voie d'activation est bien connue, sont ERK1 et ERK2.

A1 – Découverte des kinases ERKs

Au début des années 1980, lors d'étude sur la phosphorylation de la protéine ribosomale S6 dans les cellules 3T3-L1 activées avec l'insuline, ERK1 est le premier membre qui a été identifié chez les mammifères (**Cobb and Rosen, 1983**). De plus, dans les cellules 3T3-L1, en réponse à l'insuline, cette protéine a été trouvée phosphorylée sur une thréonine et une tyrosine (**Ray and Sturgill, 1988**). Puis, au début des années 1990, l'ADN d'ERK1 a été séquencé et deux protéines homologues ont été trouvées et clonées, ERK2 et ERK3 (**Boulton et al., 1990** ; **Boulton et al., 1991** ; **Boulton and Cobb, 1991**). Puis, à la suite de ces travaux, la protéine ERK4 a été identifiée (**Peng et al., 1996**) et deux autres équipes ont identifiées et séquencées ERK5 (**Lee et al., 1995** ; **Zhou et al., 1995**). Enfin, les deux derniers homologues ont été trouvés, ERK7 (**Abe et al., 1999**) et ERK8 (**Abe et al., 2002**).

A2 – Les protéines ERK1 et ERK2

Les kinases ERK1 et ERK2 sont des sérine/thréonine kinases (**Cargnello and Roux, 2011**). Elles sont exprimées dans tous les tissus humains, même si leur expression est plus importante dans le cerveau, le muscle squelettique, le thymus et le cœur. Chez l'homme, ERK1 a une masse moléculaire de 43 kDa (~ 379 acides aminés) et ERK2 de 41 kDa (~ 360 acides aminés) et lorsqu'elles sont phosphorylées, leur masse moléculaire est de 44 kDa et 42 kDa respectivement. Ces deux MAPKs partagent 83% d'identité au niveau de leur séquence peptidique (**Boulton et al., 1990 ; Boulton and Cobb, 1991 ; cf. Figure 118**). Dans les cellules humaines, différentes isoformes provenant d'épissage alternatif sont décrites, pour ERK1 (ERK1b et ERK1c), et pour ERK2 (ERK2b). Ces isoformes peuvent avoir une localisation subcellulaire et une distribution tissulaire différente de celle de leurs kinases entières respectives (**Cargnello and Roux, 2011**).

Les kinases ERK1 et ERK2 sont activées en réponse à l'insuline, ainsi qu'à des facteurs de croissance, comme PDGF (*Platelet-Derived Growth Factor*), EGF (*Epidermal Growth Factor*), et NGF (*Nerve Growth Factor*) (**Boulton et al., 1991 ; Boulton and Cobb, 1991 ; cf. Figure 117**). Dans les cellules, ERK1/2 peuvent aussi être activées par les cytokines, le stress osmotique, les ligands se fixant aux GPCRs (*G Protein-Coupled Receptors*), ou les ligands des RTKs (*Receptor Tyrosine Kinases*) (cf. **Figure 119**), ainsi que par la désorganisation des MTs (**Raman et al., 2007**).

En fin de cascade, les kinases activatrices (MEK1/2) phosphorylent les MAPKs ERK1/2 sur le motif TEY (Thr-Glu-Tyr) dans leur boucle d'activation (**Cargnello and Roux, 2011 ; Khorasanizadeh et al., 2017 ; cf. Figures 117, 118 et 119**).

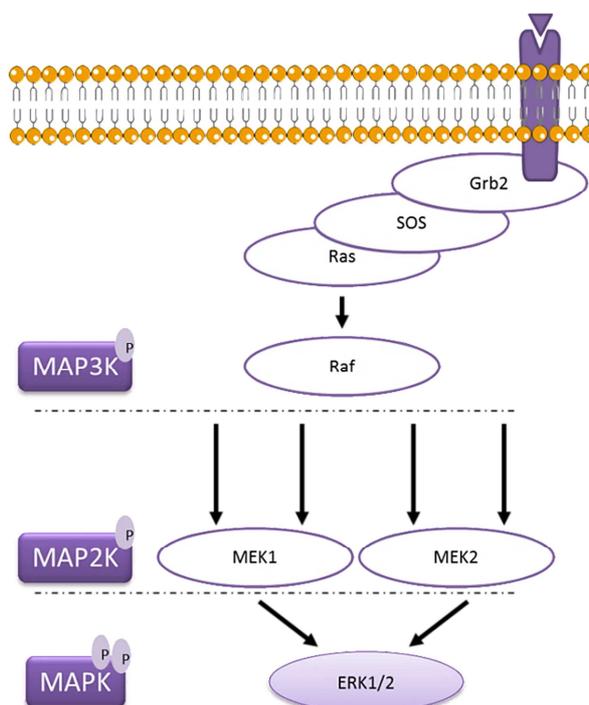


Figure 119 : Mécanisme général d'activation des ERKs, via un récepteur tyrosine kinase : la voie Ras/Raf/MEK/ERK (d'après **Khorasanizadeh et al., 2017**).

Les kinases ERK1/2 sont régulées spatialement. En effet, dans des cellules quiescentes, tous les composants de la voie de signalisation d'ERK1/2 sont dans le cytoplasme, tandis que lors d'une stimulation extracellulaire, certains composants sont relocalisés vers le noyau (**Lenormand et al., 1993**). Malgré le fait que le mécanisme d'accumulation de ces protéines dans le noyau n'est pas bien compris, il a été montré que la dimérisation, la phosphorylation et la libération à partir d'éléments d'ancrage cytosoliques jouent un rôle dans cette rétention nucléaire (**Pouysségur and Lenormand, 2003**). De plus, ERK1 et ERK2 peuvent se localiser dans le noyau grâce à leur séquence NTS (*Nuclear Translocation Signal*) insérée dans leur domaine kinase (**Zehorai et al., 2010**).

A3 - Substrats des ERKs

Après un stress, ERK1 et ERK2 sont activées par phosphorylation par leurs kinases activatrices en amont. Ensuite, elles peuvent phosphoryler une centaine de substrats dans différents compartiments cellulaires, tels que le cytoplasme, le noyau et la membrane (**Yoon and Seger, 2006** ; cf. **Figure 117**). Une étude plus récente a permis d'identifier trente-huit substrats directs d'ERK1 par la stratégie siKALIP (*stable isotope labeled Kinase Assay-Linked Phospho-proteomics*), et parmi ces derniers, plus d'un tiers étaient déjà identifiés via des méthodes de biologie moléculaire plus classiques (**Xue et al., 2014**).

Les substrats des ERKs sont très diversifiés : il y a des facteurs de transcription (ATF2 (*Activating Transcription Factor 2*), c-Jun, c-Myc, p53, STAT1/3 (*Signal Transducers and Activators of Transcription 1/3*)...), des kinases et phosphatases de la voie des ERKs (ERK1/2, MEK1/2, Raf1...), des protéines du cytosquelette (Paxilline, ainsi que des MAPs, cf. **Tableau 11**), des protéines de signalisation (EGFR (*Epidermal Growth Factor Receptor*), IRS1 (*Insulin Receptor Substrate 1*), PLC γ (*Phospholipase C*)...), des protéines apoptotiques et des protéases (Bad (*Bcl2-antagonist of cell death*), Caspase 9...), et d'autres protéines (Histone H3, MBP (*Myelin Basic Protein*), Topoisomérase II α ...) (**Pan et al., 2009** ; **Carlson et al., 2011** ; **Courcelles et al., 2013** ; **Yoon and Seger, 2006** ; **Xue et al., 2014**).

Substrats des ERKs dans l'environnement microtubulaire	Sites de phosphorylation	Impact de la phosphorylation médiée par les ERKs	Références
DYNC1H1 (<i>Dynein Cytoplasmic 1 light intermediate Chain</i>)	S400		Kosako et al., 2009 ; Courcelles et al., 2013
CENP-E (<i>Centromere-binding Protein E</i>)		La phosphorylation de CENP-E empêche l'interaction entre les chromosomes et les microtubules	Zecevic et al., 1998
CEP170 (<i>Centrosomal Protein of 170 kDa</i>)			Carlson et al., 2011
DOC1R (<i>Deleted in Oral Cancer 1 Related</i>)	Thr23 ? (souris)	La phosphorylation de DOCR1 augmente l'organisation des microtubules dans la métaphase de type II	Terret et al., 2003
Dystrophine	C-terminal	Le rôle de cette phosphorylation n'est pas clair, mais elle induit la formation de la cascade d'ERK	Shemanko et al., 1995

Tableau 11 (début)

MAP1/MAP1B (<i>Microtubule-Associated Protein 1/1B</i>)	T1788	La phosphorylation de MAP1 induit l'association des microtubules.	Sano, 1992 ; Carlson et al., 2011
MAP2 (<i>Microtubule-Associated Protein 2</i>)		C'est le premier substrat d'ERK identifié. Cette phosphorylation n'est probablement pas retrouvée <i>in vivo</i> .	Sturgill and Ray, 1986 ; Sano, 1992 ; Hoshi et al., 1992
MAP4 (<i>Microtubule-Associated Protein 4</i>)	Ser696	La phosphorylation de MAP4 peut moduler le transport des organites et le mouvement des chromosomes.	Hoshi et al., 1992
MISS (<i>MAP kinase-Interacting and Spindle-Stabilizing protein</i>)	Ser14 + autre (souris)	La phosphorylation de MISS stabilise sûrement le fuseau mitotique pendant la maturation des oocytes.	Lefevre et al., 2002
Stathmine (Oncoprotein-18)	Ser25, S38	La phosphorylation de la stathmine favorise ses effets dans la progression du cycle cellulaire et la différenciation des cellules.	Marklund et al., 1993 ; Lovrić et al., 1998 ; Pan et al., 2009
Tau	Ser199, Ser202, Thr205, Ser235, + autre	La phosphorylation de Tau conduit à la maladie d'Alzheimer.	Drewes et al., 1992 ; Buée-Scherrer and Goedert, 2002
APC	Ser2244, Ser2449, Ser2473, Thr2481, Ser2485, Ser2535, Ser2774, Ser2830	La phosphorylation d'APC inhibe son interaction avec les filaments d'actine, pendant la formation des extensions cellulaires	Caro-Gonzalez et al., 2012

Tableau 11 : Substrats des ERKs associés au cytosquelette des microtubules (d'après **Yoon and Seger, 2006 ; Tamura and Draviam, 2012 ; Xue et al., 2014**).

A4 – Fonctions des ERKs

Les kinases ERKs sont majoritairement impliquées dans de multiples voies de signalisation de régulation de la croissance et de la différenciation cellulaire, ainsi que de l'apoptose. Elles favorisent la prolifération cellulaire, en augmentant l'expression des cyclines du cycle cellulaire et en assurant la formation du fuseau mitotique, mais aussi en inactivant les gènes antiprolifératifs. En matière de différenciation cellulaire, elles participent aussi au développement du placenta, à la différenciation du mésoderme, ou encore à la différenciation des lymphocytes T et au développement des adipocytes. Concernant l'apoptose, les ERKs régulent certains facteurs anti- et pro-apoptotiques. (**Xue et al., 2014 ; Waters et al., 2014**).

A5 – Implication de la voie de signalisation des ERKs dans des maladies

La voie des ERKs peut être reliée au développement de diverses pathologies (**Kim and Choi, 2015**).

Elle contribue au cancer, du fait que ses fonctions régulatrices de la prolifération et la survie cellulaire. La transformation maligne des cellules provient d'une croissance incontrôlée et accrue, souvent due à l'apparition d'une mutation dans la voie des ERKs (**Kim and Choi, 2015**). Par exemple, des mutations dans la voie Ras/Raf/MEK/ERK sont retrouvées dans les cancers du côlon, du sein, le mélanome et la leucémie (**Chen et al., 2014b**). De plus, la voie des ERK joue un rôle dans plusieurs étapes du développement tumoral en favorisant la migration cellulaire par phosphorylation de protéines impliquées dans l'adhérence des cellules, comme la paxilline (**Huang et al., 2004**). En thérapie anticancéreuse, des traitements ciblent cette voie de signalisation, mais des mécanismes de résistance à ces molécules anticancéreuses peuvent apparaître (**Dillon et al., 2015**).

Les ERKs sont aussi impliquées dans d'autres pathologies humaines, comme la maladie de Hodgkin (**Zheng et al., 2003**), la maladie d'Alzheimer en induisant l'hyperphosphorylation de la MAP Tau (**Drewes et al., 1992**), ou la maladie de Parkinson où une expression élevée d'ERK a été retrouvée (**Kim and Choi, 2015**).

A6 – Inhibiteurs des ERKs

Au milieu des années 1990, deux compagnies ont développé des inhibiteurs synthétiques, spécifiques des MEK1/2 (les kinases activatrices en amont d'ERK1/2). Ainsi, ERK1/2 sont inactivées de manière indirecte, du fait que MEK1/2 en amont ne peuvent plus les phosphoryler (**Bain et al., 2007 ; Cargnello and Roux, 2011**).

La première classe d'inhibiteur est PD98059 [2-(2'-amino-3'-methoxyphenyl)-oxanaphthalen-4-one] (**Alessi et al., 1995 ; Dudley et al., 1995**) et la seconde est U0126 (1,4-diamino-2,3-dicyano-1, 4-bis[2-aminophenylthio]butadiene) (**Favata et al., 1998 ; cf. Figure 117**). Ce sont des inhibiteurs non-compétitifs en ce qui concerne la liaison des substrats de MEK1/2, l'ATP et ERK1/2 (**Favata et al., 1998**). Ils interagissent plus fortement avec la forme inactive de la kinase qu'avec la forme phosphorylée, active. La liaison de l'inhibiteur empêche la phosphorylation de MEK1/2 et/ou le changement conformationnel généré par la kinase active. Ces inhibiteurs sont utilisés *in vitro* et dans les cellules (**Alessi et al., 1995 ; Favata et al., 1998 ; Bain et al., 2007 ; Khorasanizadeh et al., 2017**).

D'autres inhibiteurs non-compétitifs de l'ATP ont été développés avec une meilleure biodisponibilité. Ces nouveaux inhibiteurs ont été testés en étude clinique comme potentiellement des agents anti-cancéreux (**Bain et al., 2007 ; Cargnello and Roux, 2011**).

B – La voie de signalisation cellulaire des MAPKs p38

Le nom de la famille des kinases p38 provient de la masse moléculaire (38 kDa) de la première protéine identifiée (**Han et al., 1994 ; Lee et al., 1994 ; Freshney et al., 1994 ; Rouse et al., 1994**).

B1 – Découverte des kinases p38

En 1994, le premier membre de la famille des p38 qui a été identifié c'est p38 α qui est une protéine kinase de 38 kDa. L'identification de cette kinase a été réalisée grâce à des études utilisant du LPS (*Lipopolysaccharide*) pour activer la kinase (**Han et al., 1994**), ou l'inhibition de cytokines pro-inflammatoires (IL-1 ou TNF) par des médicaments pyrimidazolés (**Lee et al., 1994**), ou encore l'activation de MAPKK par des traitements

cellulaires utilisant le choc thermique, le stress osmotique, ou l'IL-1 (**Freshney et al., 1994 ; Rouse et al., 1994**). Les trois autres membres (p38 β , p38 γ , p38 δ) appartenant à cette famille ont ensuite été identifiés dans les années 1996-1997 (**Jiang et al., 1996 ; Jiang et al., 1997**).

B2 – Les isoformes de p38

La famille des kinases p38 est constituée de quatre isoformes de p38 (α , β , γ , et δ). Elles diffèrent au niveau de leur motif d'activation (Thr-Gly-Tyr) qui est doublement phosphorylé en cas d'activation des protéines (**Raingeaud et al., 1995 ; cf. Figure 118**). Cependant, au niveau de leur séquence entière, les isoformes partagent environ 60% d'homologie (**Jiang et al., 1997**).

Dans les lignées cellulaires et les tissus, l'expression des isoformes p38 α et p38 β est ubiquitaire, tandis que l'expression de p38 γ et p38 δ est plus restreinte. L'expression des deux premières isoformes (p38 α/β) est plus forte que celle des deux autres isoformes (p38 γ/δ) (**Jiang et al., 1997**). Dans la littérature c'est souvent l'isoforme p38 α qui est décrite car cette dernière est généralement plus exprimée que l'isoforme p38 β .

Dans les cellules en quiescence, les isoformes de p38 sont présentes dans le noyau ainsi que dans le cytoplasme. Après certains stress, elles s'accumulent dans le noyau des cellules (**Raingeaud et al., 1995**).

B3 - Mécanismes d'activation de p38

Dans les cellules de mammifères, les quatre isoformes de p38 sont fortement activées par divers stress environnementaux, tels que, le stress oxydant, les irradiations UV, l'hypoxie, l'ischémie. Elles sont aussi activées par des médiateurs extracellulaires de l'inflammation, tels que des chimiokines, des cytokines, comme, l'IL-1 (*Interleukin-1*), et le TNF α (*Tumor Necrosis Factor α*), mais aussi le LPS (*Lipopolysaccharide*) bactérien. Les isoformes de p38 sont également activées par les GPCRs, ainsi que les GTPases (Rac1 et Cdc42) de la famille Rho (**Raingeaud et al., 1995 ; Cargnello and Roux, 2011 ; Khorasanizadeh et al., 2017 ; cf. Figures 117 et 120**).

Certaines MAP3Ks activatrices de la voie de p38 sont communes avec celles de la voie d'activation des JNK (cf. **page 183**), telles qu'ASK1, Tpl2, TAK1, MEKK3/4 et MLK3 (cf. **Figures 117, 120, 121 et 122**). Les MAP3Ks (OKL1, TOA1/2, et ZAK1) sont spécifiques de la voie d'activation de p38. Quand les MAP3Ks sont activées par phosphorylation, elles peuvent ensuite activer les MAP2Ks (MKK3 et MKK6), qui sont les kinases activatrices de p38 (cf. **Figure 120**). MKK6 est capable d'activer les quatre isoformes de p38, tandis que MKK3 active principalement p38 α , p38 γ et p38 δ . Il est important de noter qu'en plus de ces deux MAP2Ks, la kinase activatrice des JNKs, MKK4 (cf. **Figures 117, 121 et 122**) peut aussi activer p38 α (**Cargnello and Roux, 2011 ; Cuadrado and Nebreda, 2010 ; cf. Figure 120**). L'activation des isoformes de p38 nécessite une double phosphorylation catalysée par MKK3/6 dans un motif TGY (Thr-Gly-Tyr) conservé dans la boucle d'activation du domaine kinase (**Raingeaud et al., 1995 ; cf. Figure 118**). Une fois que p38 est activée, elle agit sur de nombreux substrats nucléaires ou cytoplasmiques (cf. **Figure 120**).

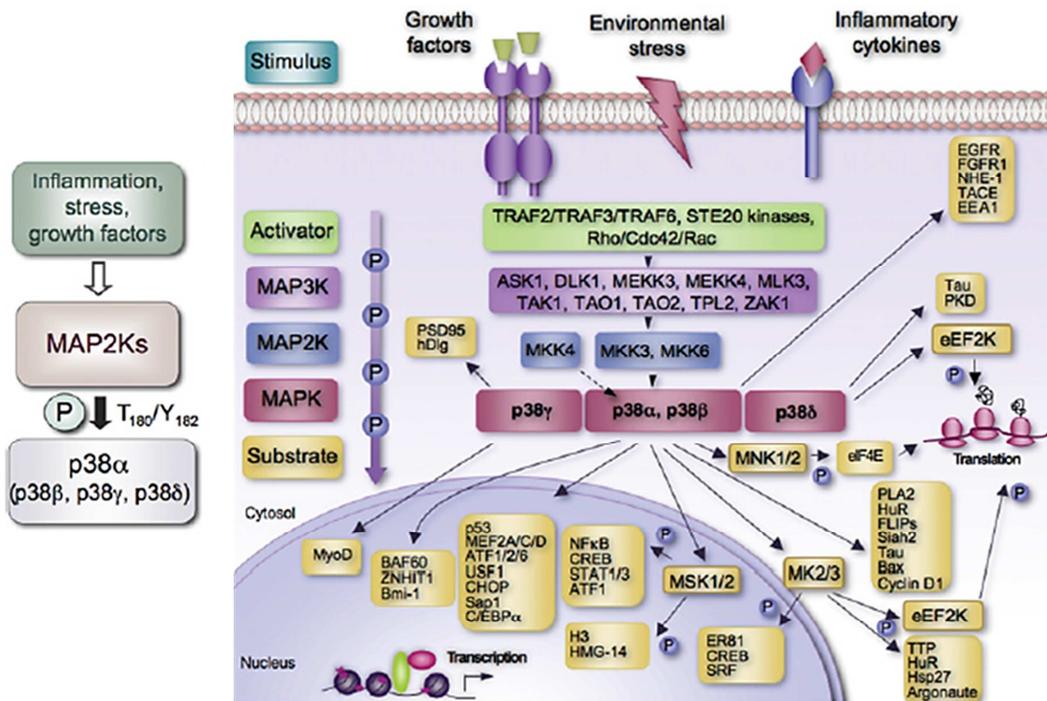


Figure 120 : Mécanisme d'activation de la voie des MAPKs p38 (d'après Cuadrado and Nebreda, 2010).

B4 – Substrats de p38

Après stimulation, les isoformes de p38 phosphorylent un grand nombre de substrats dans différents compartiments cellulaires.

Dans le noyau, les substrats de p38 sont majoritairement des facteurs de transcription, comme, par exemple p53, MEF2A/C/D (*Myocyte Enhancer Factor 2A/C/D*), ATF1/2/6 (*Activating Transcription Factor 1/2/6*), CHOP (*C/EBP (CCAAT/Enhancer-Binding Protein)-Homologous Protein*), Sap1 (*SRF accessory protein 1*)... Ce sont aussi des kinases, telles que MSK1/2 (*Mitogen- and Stress-activated Kinase 1/2*) qui pourront activer des facteurs de transcription, tels que l'isoforme p65 de NF-κB (*Necrosis Factor-κB*), CREB (*cAMP Responding Element-Binding protein*), STAT1/3 (*Signal Transducer and Activator of Transcription 1/3*)..., mais aussi les protéines du nucléosome, soit l'histone H3 ou HMG-14 (*High-Mobility Group 14*) (Cuadrado and Nebreda, 2010 ; Cargnello and Roux, 2011).

Dans le cytoplasme, les substrats de p38 qui ont été reportés sont cPLA2 (*cytoplasmic Phospholipase A2*), MNK1/2, MK2/3, Elk-1, la protéine Tau, la cycline D1... (Cuadrado and Nebreda, 2010 ; Cargnello and Roux, 2011 ; cf. Figure 120).

Dans une autre étude, en condition basale, soixante-six substrats directs de p38α ont été recensés et classés en huit groupes différents en fonction de leurs fonctions biologiques respectives. Ces groupes rassemblent des facteurs de transcription (ATF2, c-Jun, p53, STAT1/4...), des protéines se liant à l'ADN ou l'ARN (histone H3...), des Ser/Thr kinases (GSK3β, MK2/5, MNK1/2...), des protéines régulatrices (Caspase3/8, Cyclin D1/3, JIP4...), des protéines/récepteurs membranaires (EGFR (*Epidermal Growth Factor Receptor*), FGFR1 (*Fibroblast Growth Factor Receptor 1*)...), des protéines des endosomes, et des protéines structurales (Kératine 8...) (Trempelec et al., 2013).

Il est important de noter que parmi les substrats de p38, il y a des protéines de l'environnement microtubulaire, comme DYNC1I2 (*Dynein Cytoplasmic 1 Intermediate*

Chain 2), la protéine Tau (**Buée-Scherrer and Goedert, 2002 ; Cuadrado and Nebreda, 2010**), la stathmine (**Parker et al., 1998**), ou l' α -tubuline (**Iida et al., 2014**).

Toutes les isoformes de p38 phosphorylent leurs substrats sur des résidus sérines ou thréonines, qui sont habituellement suivis d'un résidu proline (motifs S/T-P). En effet, environ 83% des sites de phosphorylation de p38 α décrits, correspondent à des motifs Ser-Pro ou Thr-Pro (**Trempelec et al., 2013**).

B5 – Fonctions de p38

La voie de signalisation de p38 joue un rôle essentiel dans l'immunité et les réponses inflammatoires (**Cuadrado and Nebreda, 2010 ; Cargnello and Roux, 2011**). En effet, une fonction majeure des isoformes de p38 est la production et la régulation de l'expression des cytokines et interleukines pro-inflammatoires. Elles peuvent contrôler le niveau d'expression des cytokines en modulant des facteurs de transcription, comme NF- κ B (*Nuclear Factor- κ B*) (**Karin, 2006**), ou TNF α (**Sabio and Davis, 2014**).

Les MAPKs p38 participent aussi à la prolifération et la survie cellulaire. Par exemple, p38 α régule négativement la progression du cycle cellulaire au niveau des transitions G1/S et G2/M. De plus, elles régulent le cycle cellulaire en augmentant l'activité de Cdk1 et la formation du fuseau mitotique. D'autres études ont montré des fonctions dans l'induction de l'apoptose. De manière générale, les MAPKs p38 sont impliquées dans la survie et la mort cellulaire en régulant des facteurs anti- et pro-apoptotiques (**Cuadrado and Nebreda, 2010 ; Cargnello and Roux, 2011**).

Les isoformes de p38 ont aussi des rôles spécifiques dans le métabolisme hépatique, des adipocytes, du pancréas et de la moelle osseuse, du fait que plusieurs de ses substrats sont impliqués dans des processus métaboliques. Par exemple, au niveau du foie, certains de ses substrats, comme PPAR α , CREB ou C/EBP α , sont impliqués dans la gluconéogenèse, l'homéostasie du glucose, la β -oxydation des acides gras et le stress du RE. Dans les cellules dérivées de la moelle osseuse, p38 γ/δ contrôle la production de TNF α , ainsi que l'inflammation et la migration des cellules immunitaires, tandis qu'au niveau du pancréas, p38 δ contrôle la sécrétion de l'insuline (**Manieri and Sabio, 2015**).

Après un stress génotoxique, les MAPKs p38 jouent également un rôle essentiel dans l'induction de l'autophagie en phosphorylant GSK3 β ou la Thr75 d'Atg5 (*Autophagy-related 5*), ainsi que de l'apoptose via son substrat NAG-1 (*Non-steroidal anti-inflammatory drug Activated Gene-1*) (**Sui et al., 2014**). Elles peuvent aussi inhiber l'apoptose via COX-2 (*Cyclooxygenase-2*) ou Hsp-27 (*Heat-shock protein 27*) par exemple (**Sui et al., 2014**).

B6 – Implication de la voie de p38 en pathologie

Dans différents types de cancer (poumons, foie, sein), p38 est activée, mais l'activité de p38 est ambivalente dans la transformation maligne. En fonction du stade et du tissu tumoral, p38 favorise le développement tumoral, ou au contraire joue un rôle de suppresseur de tumeur (**Gupta and Nebreda, 2015**). Par exemple, plusieurs agents de chimiothérapie utilisés en thérapie anticancéreuse nécessitent l'activité de p38 pour initier l'apoptose (**Sui et al., 2014**).

Une dérégulation de l'activation de p38 est aussi retrouvée dans les maladies inflammatoires (Gupta and Nebreda, 2015), comme l'asthme (Khorasanizadeh *et al.*, 2017), des pathologies neurodégénératives, telles que la maladie d'Alzheimer et la maladie de parkinson (Kim and Choi, 2015), ainsi que des maladies du métabolisme (Manieri and Sabio, 2015).

B7 – Inhibiteurs de la kinase p38

Dans plusieurs études afin de diminuer les fonctions de p38, deux molécules anti-inflammatoires relativement proches, SB203580 (4-(4-Fluorophenyl)-2-(4-methylsulfinylphenyl)-5-(4-pyridyl)-1H-imidazole) et SB202190 (4-(4-Fluorophenyl)-2-(4-hydroxyphenyl)-5-(4-pyridyl)-1H-imidazole) ont été utilisées (cf. Figure 117). Ces composés ciblent et inhibent spécifiquement les isoformes p38 α et p38 β en agissant comme un inhibiteur compétitif de la liaison de l'ATP. Ces composés sont utilisés en culture cellulaire afin d'inhiber les MAPKs p38 (Cuenda *et al.*, 1995 ; Bain *et al.*, 2007 ; Khorasanizadeh *et al.*, 2017).

II – La voie de signalisation des JNKs

Lors de ma thèse, je me suis plus particulièrement intéressée à la famille des JNKs (*c-Jun NH2-terminal Kinases*), aussi appelées SAPKs (*Stress-Activated Protein Kinases*). Celles-ci sont des membres de la famille des MAPKs (*Mitogen-Activated Protein Kinases*).

Tout comme les deux autres membres de la famille des MAPK (ERK et p38), les JNKs sont des Ser/Thr kinases. Dans les cellules eucaryotes, elles relayent, amplifient et intègrent des signaux provenant d'un grand nombre de stress extra- ou intracellulaires et engendrent les réponses cellulaires dédiées.

A – Découverte des JNKs

Les JNKs ont été identifiées au début des années 1990, chez le rat, au cours d'une étude sur l'injection intra-péritonéale de cycloheximide (Hibi *et al.*, 1993 ; Kyriakis and Avruch, 1990). En 1994, la première protéine humaine a été découverte et appelée JNK1. La même année, l'homologue de la protéine identifiée chez le rat, a été découvert et appelé JNK2. Ces deux kinases ont ensuite été clonées (Dérjard *et al.*, 1994 ; Kallunki *et al.*, 1994 ; Kyriakis *et al.*, 1994). Puis, en 1996, le troisième membre de la famille des JNKs, JNK3 a été identifié (Gupta *et al.*, 1996).

B – Les voies de signalisation des JNKs

La voie de signalisation des JNKs peut contrôler divers processus via une grande diversité d'effecteurs (cf. Figure 121).

B1 – Activation de la voie de signalisation des JNKs

L'activation de la voie des JNKs intervient en réponse à un grand nombre de stimuli, tels que l'infection, l'inflammation (cytokines inflammatoires), le stress oxydant, les dommages à l'ADN, le stress osmotique, les changements du cytosquelette, le stress du

réticulum endoplasmique ; mais aussi en aval de récepteurs, comme les récepteurs GPCRs (*G-Protein Coupled Receptors*), Wnt, TGF- β (*Transforming Growth Factor- β*), TNF (*Tumor Necrosis Factor*), et TLR (*Toll-Like Receptor*) (Sabio and Davis, 2014 ; Zeke *et al.*, 2016 ; cf. Figures 117 et 121).

L'activation des JNKs par les radiations UV suppose une lésion à l'ADN par cassure double brin (Pico and Pagès, 2013). Les ROS qui sont produits lors d'un stress oxydant, peuvent activer JNK en activant ses kinases spécifiques, comme ASK1 (une MAP3K). Les petites GTPases, Rac1 et Cdc42, des protéines essentielles pour la formation des lamellipodes et le mouvement cellulaire (Kuroda *et al.*, 1996), sont aussi capables d'activer JNK (Zeke *et al.*, 2016 ; cf. Figure 121).

L'activation des JNKs génère des signaux intracellulaires contradictoires, du fait de leurs rôles dans l'apoptose, la prolifération et la survie cellulaire. Ces fonctions contradictoires ont été attribuées aux différents substrats que les JNKs modulent (Bode and Dong, 2007).

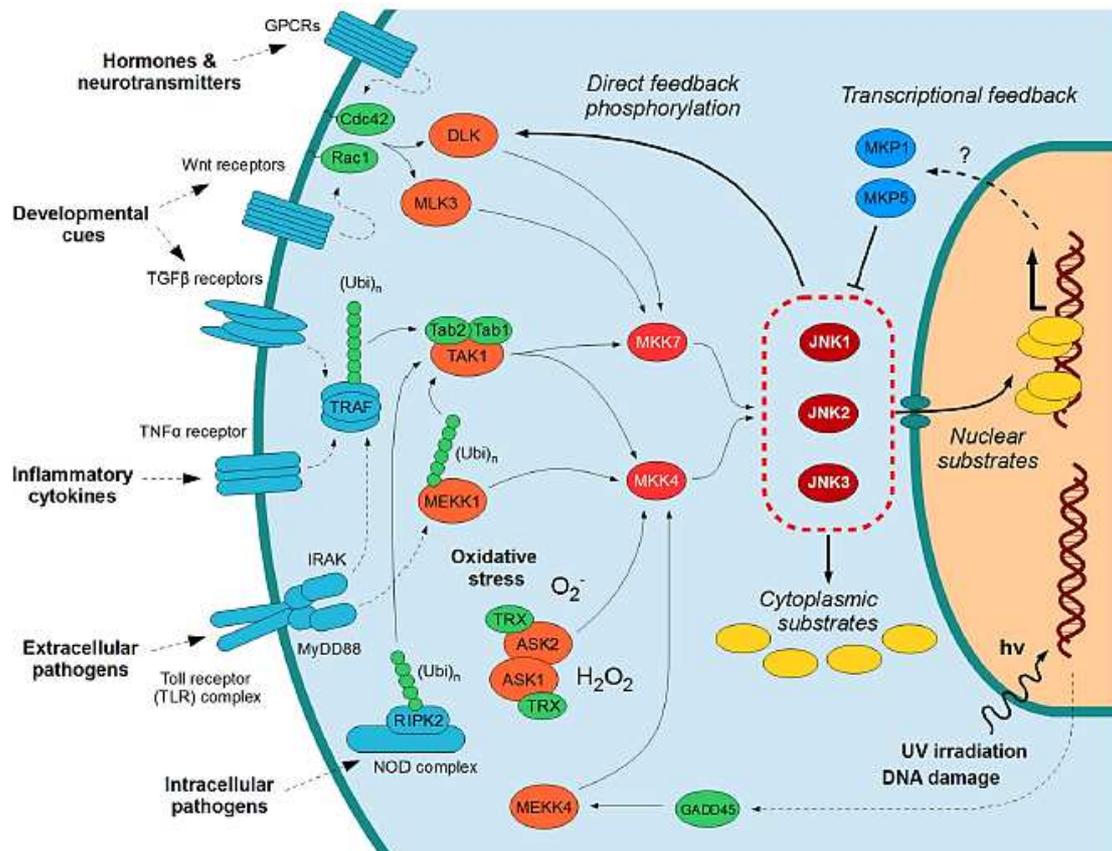


Figure 121 : Organisation générale de la voie d'activation des JNKs. Une grande variété de stress extracellulaires (comme, les cytokines, pathogènes, hormones...), ainsi qu'intracellulaires (tels que, le stress oxydant, le dommage à l'ADN via les radiations UV...) convergent et activent via la cascade des MAPKs (en rouge) les trois JNKs (en rouge sombre). Ces JNKs une fois activées, phosphorylent une grande variété de substrats cytoplasmiques et nucléaires. Les flèches continues correspondent à une interaction ou à des réactions enzymatiques directes, tandis que les flèches en pointillés impliquent des réactions multi-étapes indirectes et des connexions dont le mécanisme exact est inconnu (Zeke *et al.*, 2016).

Le schéma d'activation des JNKs est commun à celui des autres MAPKs. En effet, l'activation finale des JNKs est le résultat de l'activation en cascade des MAP3Ks (ASK1/2,

MEKK1/2/3/4, MLK1/2/3, DLK, TAK1, Tpl2) et des MAP2Ks (MKK4/7) (**Hotamisligil and Davis, 2016 ; Zeke et al., 2016 ; cf. Figures 117, 121 et 122**). La première étape de cette cascade est l'activation des MAP3Ks via différents signaux extra- ou intracellulaires (**Zeke et al., 2016**). Puis, les MAP3Ks ainsi phosphorylées et donc actives peuvent phosphoryler, à leur tour les MAP2Ks afin de les activer. La dernière étape de la cascade correspond à l'activation des JNKs via les MAP2Ks (**Weston and Davis, 2007 ; Zeke et al., 2016 ; cf. Figures 117, 121 et 122**).

Les MAP2Ks activatrices en amont de JNK sont MKK4 (*Mitogen-activated protein Kinase Kinase 4*) et MKK7 (*Mitogen-activated protein Kinase Kinase 7*) (cf. **Figures 117, 121 et 122**). Elles phosphorylent directement les JNKs sur un motif Thr/Pro/Tyr (TPY) localisé dans le domaine kinase et donc induisent leur activation (cf. **Figure 118**). Cette activation par phosphorylation est commune aux autres MAPKs. L'activation complète de JNK nécessite une double phosphorylation de la Thr183 et la Tyr185, sachant que MKK4 phosphoryle préférentiellement la Tyr185, tandis que MKK7 phosphoryle préférentiellement la Thr183 (**Bode and Dong, 2007**).

Il est important de noter que MKK7 est préférentiellement activée par des cytokines inflammatoires, comme l'IL-1 ou le TNF, mais aussi par des pathogènes intracellulaires, ou encore des hormones de croissance (**Davis, 2000 ; Zeke et al., 2016**). En revanche, MKK4 est préférentiellement activée par des facteurs de stress et peut aussi activer p38 (**Davis, 2000 ; Zeke et al., 2016**).

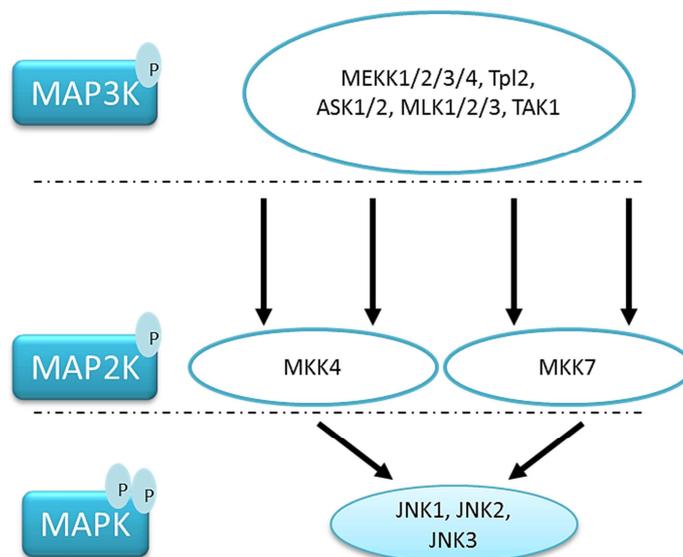


Figure 122 : Mécanisme général de la voie d'activation des JNKs (d'après **Hotamisligil and Davis, 2016 ; Zeke et al., 2016 ; Khorasanizadeh et al., 2017**)

Dans des conditions basales, les JNKs sont retrouvées dans le cytoplasme. En revanche, après activation de leur voie, comme pour ERK1/2 et p38, les JNKs changent leur localisation subcellulaire et vont préférentiellement vers le noyau. Cependant, les JNKs, comme la plupart des MAPKs conventionnelles à l'exception d'ERK5 n'ont pas de motifs NLS (*Nuclear Localization Sequence*) permettant l'importation nucléaire (**Zeke et al., 2016**). La translocation nucléaire des JNKs actives ou inactives peut aussi être médiée par diverses β -importines, comme, par exemple l'importine-3, l'importine-7 et l'importine-9 (**Zehorai**

and Seger, 2014). L'importation nucléaire peut également être régulée par des substrats des JNKs localisés dans le noyau, indépendamment de l'activité des JNKs. Par exemple, après l'expression de c-Jun, l'accumulation de JNK2 dans le noyau est favorisée (**Schreck et al., 2011**).

Cette localisation subcellulaire des JNKs est importante car elle dicte l'accès à leurs substrats.

B2 – Inhibition des JNKs

Afin de contrôler la durée et l'amplitude d'activation des JNKs, des phosphatases peuvent dé-phosphoryler leur motif TPY d'activation, agissant comme des régulateurs négatifs.

Parmi ces phosphatases, il y a des tyrosines phosphatases, ou des sérines/thréonines phosphatases, comme, par exemple PP2A, PP5, qui sont également connus pour déphosphoryler les MAPKs (**Hotamisligil and Davis, 2016 ; Zeke et al., 2016**).

Une attention plus particulière a été portée sur les MKPs (*Mitogen-activated protein (MAP) Kinase Phosphatases*) appartenant à la famille des DUSPs (*Dual-Specificity Phosphatases*). Ces phosphatases dé-phosphorylent de façon spécifique, les phospho-sérines/thréonines, ainsi que les phospho-tyrosines. Les MKPs sont divisées en deux sous-familles, les phosphatases principalement nucléaires (MKP1 et MKP2) et les phosphatases majoritairement cytoplasmiques (MKP3, MKP5, MKP6, MKP7) (**Weston and Davis, 2007 ; Zeke et al., 2016 ; cf. Figure 121**). La plupart de ces MKPs ne déphosphorylent pas qu'un seul substrat (**Zeke et al., 2016**). Par exemple MKP1 et MKP2 ciblent les JNKs, mais aussi ERK1/2 et p38 (**Wu and Bennett, 2005**). Les MKPs sont donc des acteurs importants régulant l'activation de la voie de signalisation des MAPKs, en durée et en amplitude.

B3 – Les protéines d'échafaudage des JNKs

Les protéines d'échafaudage des JNKs permettent le rapprochement spatial des composants de la voie afin de faciliter leur activation. De plus, elles jouent un rôle dans la localisation subcellulaire des JNKs et leur durée d'activation des JNKs. En effet, en séquestrant les composants de la voie des JNKs, ces derniers ne peuvent plus interagir avec des protéines inactivatrices (**Zeke et al., 2016**).

La principale famille de protéines d'échafaudage pour les JNKs, sont les JIPs (*JNK-Interacting Proteins*) (**Zeke et al., 2016**).

Cette famille compte quatre membres qui sont regroupés en deux groupes selon leur similitude de séquence : JIP1 avec JIP2 et JIP3 avec JIP4. Ces protéines possèdent différentes isoformes (**Whitmarsh, 2006**). Les JIP1 et JIP2 sont plus exprimées dans les neurones. Afin de lier les cargaisons, les JIPs dimérisent.

Il a été montré que la liaison des JIP1 et JIP3 à MKK7 permet d'augmenter l'activation de JNK (**Whitmarsh, 2006 ; Kelkar et al., 2000**). En revanche, si JIP4 interagit avec MKK4, JNK et p38, cela entraîne une diminution de la phosphorylation et donc de l'activation des MAPKs (**Tanaka et al., 2014**).

Concernant la structure de JIP1, elle contient un domaine N-terminal non structuré régulateur dont la fonction est inconnue, mais qui est fortement phosphorylé par JNK de

manière dépendante d'un motif D (cf. **page 192**), et un domaine C-terminal contenant trois domaines repliés. Parmi ceux-ci, il y a un site de liaison des cargaisons, appelé PTB (*PhosphoTyrosine-Binding* ou *Protein Tail-Binding*), une interface de dimérisation, SH3 (*Src Homology 3*) pour les protéines JIP1 et JIP2, et un module auxiliaire aidant la liaison aux cargaisons médiée par le domaine PTB. Les derniers acides aminés dans la partie C-terminale de JIP1 forment un motif de liaison à la KLC (*Kinesin Light Chain*) (**Whitmarsh, 2006 ; Zeke et al., 2016 ; cf. Figure 123**).

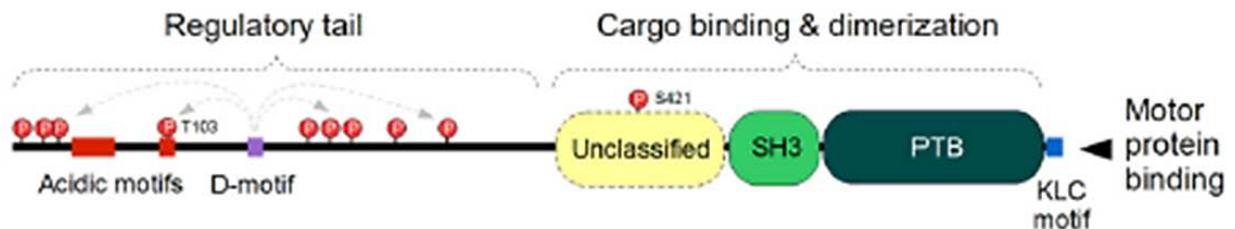


Figure 123 : Structure de JIP1. La queue N-terminale est désordonnée et la partie C-terminale contient trois domaines structuraux, ainsi que le motif de liaison à la chaîne légère de la kinésine (**Zeke et al., 2016**)

Le motif de liaison à la KLC permet aux JNKs associées à JIP1 d'interagir indirectement avec la kinésine-1, via sa chaîne légère (KLC-1) (cf. **page 131**). Cette association permet à la cellule de transporter des cargaisons, mais aussi les composants de la voie des JNKs le long des MTs via la kinésine-1 (**Verhey et al., 2001 ; Hirokawa and Noda, 2008**). Ainsi, JIP1 transporte la cascade de kinases des JNKs de manière dépendante de la kinésine-1 dans l'environnement microtubulaire (**Zeke et al., 2016 ; cf. Figure 124**).

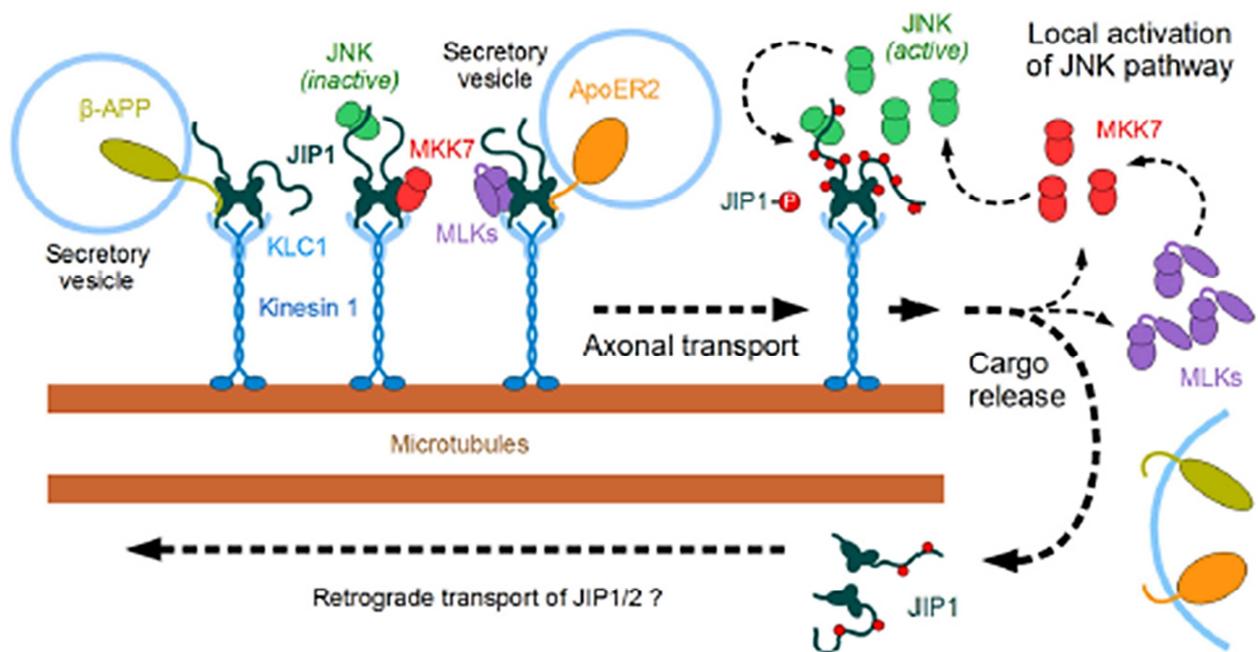


Figure 124 : Recrutement de la voie des JNKs le long des microtubules via une protéine adaptatrice des JNKs, JIP1 et la kinésine-1 dans les neurones (d'après **Zeke et al., 2016**).

Il est important de noter que le degré de phosphorylation de JIP1 par JNK régule son comportement. Deux sites de phosphorylation ont été décrits, le Thr103 et la Ser421. Ces

derniers sont contenus dans la queue N-terminale de JIP1 et régulent le trafic des cargaisons le long des MTs, en assurant notamment leur libération du complexe JIP1/kinésine-1/cargaison (Nihalani *et al.*, 2003 ; cf. **Figure 124**). Il en est de même pour les kinases de la cascade des JNKs. Elles sont libérées lorsque JIP1 est phosphorylée par JNK. Une fois que les JIPs sont libérées de leur cargaison, elles sont transportées dans la direction inverse le long des MTs grâce au complexe dynéine/dynactine (Zeke *et al.*, 2016 ; cf. **Figure 124**).

À côté des JIPs, d'autres protéines ont été décrites comme protéines d'échafaudage de JNK. C'est le cas de SKRP1 (*SAPK pathway-Regulating Phosphatase 1*) qui est une MKP, soit une phosphatase des MAPKs, ou de POSH, ou encore de l'arrestine-3 (Zama *et al.*, 2002 ; Kukekov *et al.*, 2006 ; Zhan *et al.*, 2014).

C – Les isoformes des JNKs

Chez les humains, JNK1, JNK2, JNK3 (environ 400 acides aminés) sont codées par trois gènes relativement proches *JNK1*, *JNK2*, et *JNK3* respectivement (Gupta *et al.*, 1996). Les ARN messagers de ces trois gènes subissent différents mécanismes d'épissage alternatif (cf. **Figure 125**), produisant dix isoformes différentes. Pour JNK1 et JNK2, respectivement quatre isoformes sont dénombrées, tandis que pour JNK3 huit isoformes sont possibles, mais seulement trois sont caractérisées. Les cinq autres isoformes ont seulement été décrites au niveau de l'ARNm et non de la protéine (Yates *et al.*, 2016).

Les isoformes de JNK1 et JNK2 diffèrent au niveau de l'exon 6 dupliqué dans le domaine kinase à l'origine de la région variable α ou β . Elles possèdent un domaine C-terminal plus ou moins long (cf. **Figure 125**). Elles font entre 46 kDa pour les isoformes courtes et 54 kDa pour les isoformes longues. Dans les mêmes tissus, JNK1 est préférentiellement exprimée sous sa forme courte p46 (de 46 kDa), tandis que, JNK2 est principalement exprimée sous sa forme longue p54 (de 54 kDa) (Gupta *et al.*, 1996 ; Zeke *et al.*, 2016).

Concernant JNK3, ses isoformes diffèrent de la même manière que les isoformes de JNK1 et JNK2. Cependant, elles ont un codon ATP supplémentaire dans leur partie N-terminale, donnant une protéine plus longue en N-terminal (cf. **Figure 125**).

Les isoformes incorporant l'exon 6a sont appelées JNK1 α et JNK3 α , mais JNK2 β , tandis que les isoformes contenant l'exon 6b sont JNK1 β , JNK3 β et JNK2 α (Zeke *et al.*, 2016 ; cf. **Figure 125**).

L'ensemble de ces isoformes ont 85% d'homologie au niveau de leur domaine kinase (Coffey, 2014).

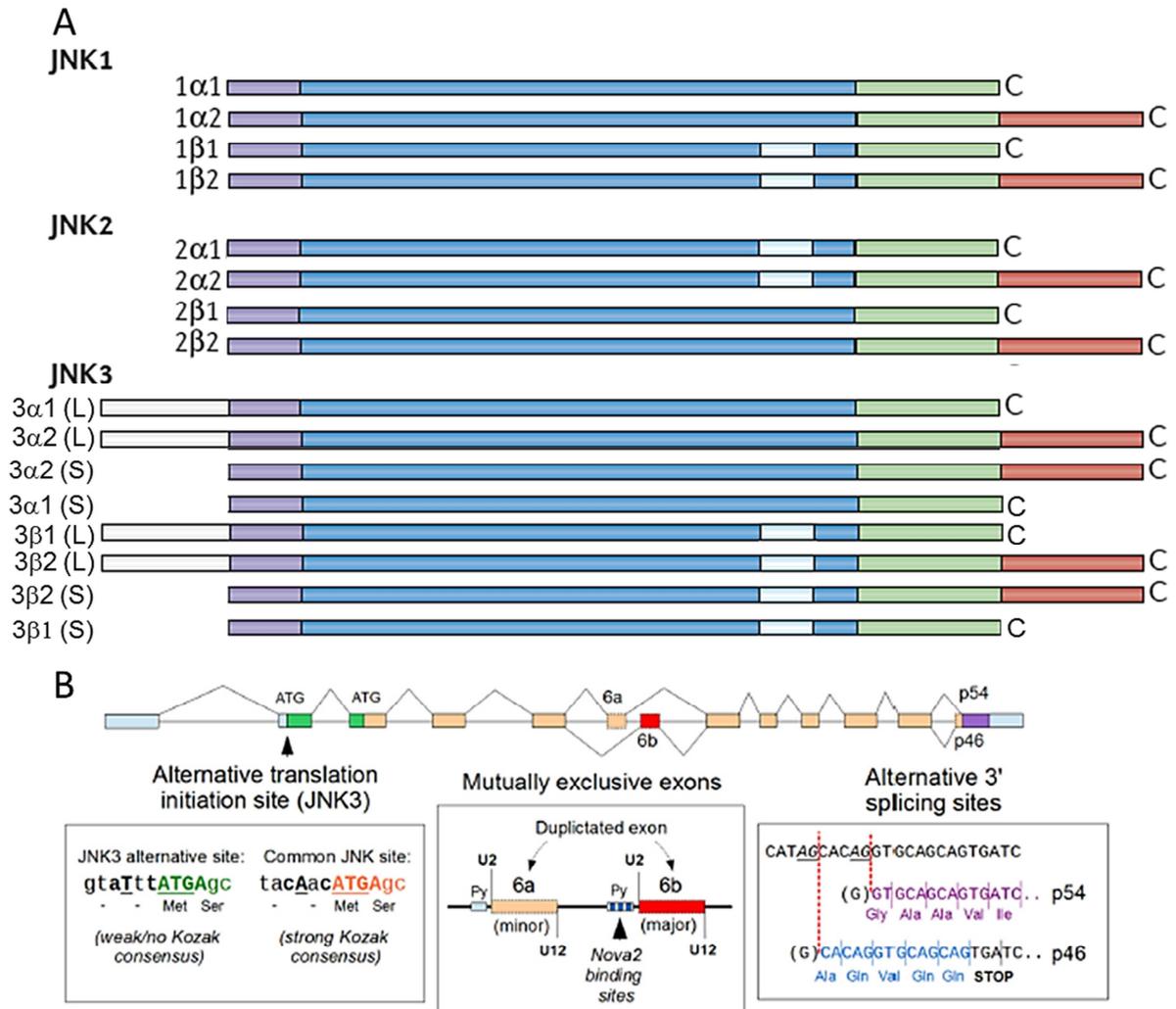


Figure 125 : L'épissage alternatif des trois gènes humains codant pour les JNKs. (A) Tous les gènes humains codant les JNKs et leurs seize isoformes, dont dix sont bien caractérisées. Les isoformes possèdent dans leur domaine kinase (en bleu), soit l'exon 6a (en bleu), soit l'exon 6b (en bleu clair), et ont un domaine C-terminal (en rouge) plus ou moins long (d'après **Coffey, 2014** ; **Zeke et al., 2016**). (B) Mécanisme d'épissage des gènes de JNK pour la génération des isoformes chez les vertébrés. Le gène *JNK3* possède un codon ATG (en vert) supplémentaire dans sa partie N-terminale, à l'origine d'une partie N-terminale (en violet clair) plus ou moins longue dans la protéine. Tous les gènes de JNK ont un exon 6 dupliqué (6a (en beige) ou 6b (en rouge)), à l'origine des régions variables α ou β . Le dernier mécanisme d'épissage provient du décalage du cadre de lecture à l'origine d'un codon stop prématuré dans la forme p46 (en bleu) qui est tronquée de la partie C-terminale de la protéine. En revanche, s'il n'y a pas de décalage du cadre de lecture, tous les exons de la protéine sont traduits, donnant l'isoforme p54 (en violet), qui est plus longue (**Zeke et al., 2016**).

Les isoformes longues (p54) de JNK1 et JNK2 ont un site de clivage par les caspases et pendant l'apoptose induite par le stress, les caspases coupent les JNKs sur ce site (**Enomoto et al., 2003**). De plus, l'isoforme JNK3 α 2 (L) est palmitoylée dans son domaine C-terminal par la palmitoyltransférase ZDHHC15 de la famille de DHHC, tandis que le JNK1 α 2 ayant un domaine C-terminal quasiment identique (cf. **Figure 125**) n'est pas palmitoylée. La palmitoylation de JNK3 α 2 (L) régule sa localisation subcellulaire et son activité (**Yang et al., 2012**).

Les isoformes α - de JNK2, contenant l'exon 6b (c'est-à-dire, JNK2 α 1 et JNK2 α 2) sont les seules à pouvoir s'auto-phosphoryler et s'auto-activer efficacement en absence de kinases activatrices (Pimienta *et al.*, 2007 ; Nitta *et al.*, 2008 ; cf. Figure 126). L'activation constitutive des isoformes de JNK2 nécessite la formation d'un homodimère, la phosphorylation du motif TPY et la translocation dans le noyau (Nitta *et al.*, 2008 ; Nitta *et al.*, 2010 ; cf. Figure 126).

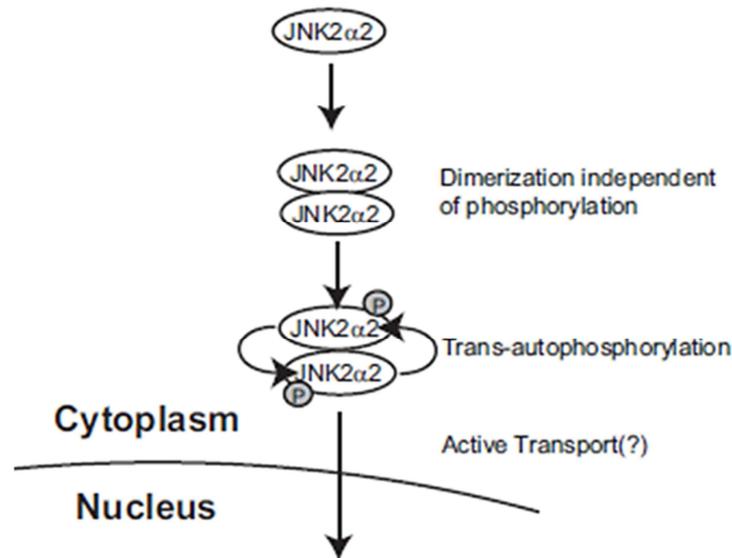


Figure 126 : Mécanisme de l'activation constitutive des JNKs, exemple de JNK2 α 2 (d'après Nitta *et al.*, 2008).

De manière générale, l'expression des kinases JNK1 et JNK2 est ubiquitaire, tandis que JNK3 est majoritairement exprimée dans le cerveau, les testicules et le cœur (Davis, 2000 ; Bode and Dong, 2007 ; Hotamisligil and Davis, 2016 ; Zeke *et al.*, 2016). Cependant, des différences d'expression en fonction de la forme α - ou β - des isoformes de JNK1 et JNK2 ont été identifiées. Par exemple, les isoformes α - de JNK2 (JNK2 α 1 et JNK2 α 2) sont préférentiellement exprimées dans des tissus non neuronaux (Ule *et al.*, 2003), tandis que, les deux isoformes α - et β - de JNK1 sont retrouvées dans les cellules immunitaires et les fibroblastes (Dreskin *et al.*, 2001).

D – Structure des JNKs

Chez les eucaryotes, les JNKs font partie de la superfamille des protéines kinases. Leur structure primaire présente des régions conservées retrouvées dans toutes les protéines kinases, tel que le domaine Ser/Thr kinase canonique (Hanks *et al.*, 1988 ; Hanks and Hunter, 1995).

Les structures cristallines de JNK1 (Heo *et al.*, 2004), JNK2 (Shaw *et al.*, 2008) et JNK3 (Xie *et al.*, 1998) ont été élucidées en présence d'un analogue d'ATP ou de petite molécules inhibitrices.

Les structures tridimensionnelles des JNKs ont un repliement typique des protéines kinases eucaryotes comprenant deux domaines : un domaine N-terminal riche en feuillets β et un domaine C-terminal riche en hélices α . Les deux domaines N- et C-terminaux sont connectés par deux segments peptidiques. Les substrats des JNKs peuvent se lier dans le

sillon entre les deux boucles N- et C-terminales de la kinase et l'ATP se lie aussi près du domaine d'interface (**Zeke et al., 2016** ; cf. **Figure 127**).

En plus de leur domaine kinase central unique, les JNKs ont d'autres caractéristiques structurales communes aux MAPKs, comme un site de *docking* (*D-site*) constitué d'une petite région CD (*Common Docking site*) chargée négativement et d'un sillon hydrophobique de *docking*. Ils ont également, un insert CMGC et le site FxFP, ainsi qu'une hélice en C-terminal liant la boucle en N-terminal et l'élongation du domaine kinase en C-terminal. Le site FxFP (motif Phe-x-Phe-Pro) est localisé entre la boucle d'activation phosphorylée et l'insert CMGC (**Nguyen et al., 2015** ; **Zeke et al., 2016** . cf. **Figure 127-B**). La partie C-terminale des JNKs est plus longue que celle des autres MAPKs (ERKs et p38) due à une insertion de douze acides aminés (**Cargnello and Roux, 2011** ; cf. **Figure 118**).

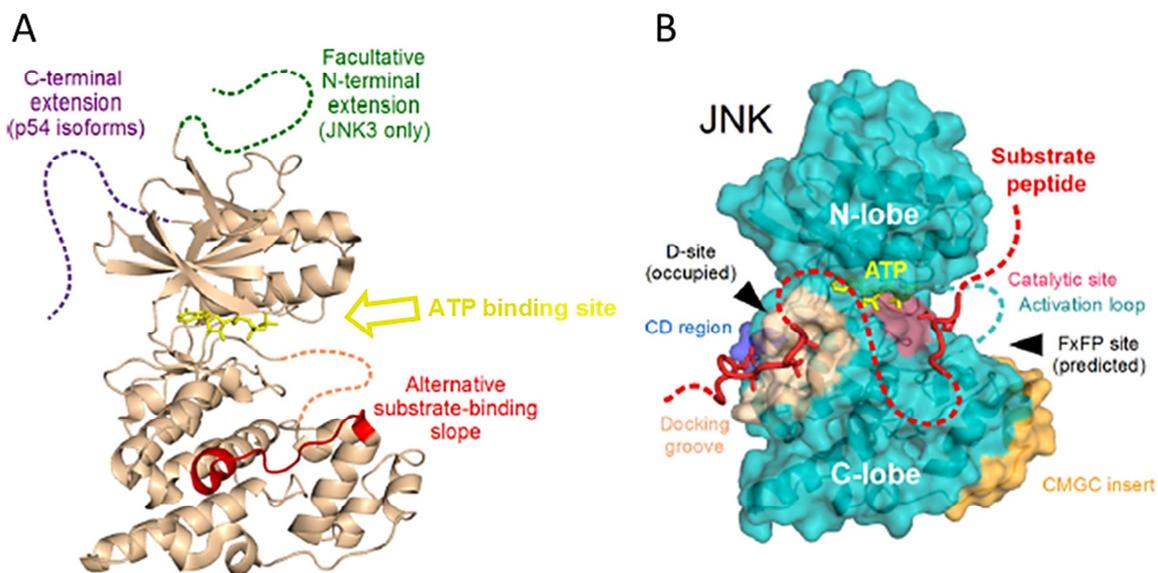


Figure 127 : Caractéristiques structurales des JNKs (d'après **Zeke et al., 2016**). (A) Structure tridimensionnelle générale des JNKs (en beige) provenant de la structure cristalline de JNK1 β 1, issue de la PDB (ID 2XRW), et représentation des régions alternatives des isoformes (l'extension du domaine C-terminal (en violet), la région variable α ou β (en rouge), et l'extension du domaine N-terminal (en vert) uniquement pour JNK3), ainsi que le site catalytique dans le domaine kinase fixant l'ATP (en jaune). Les parties non structurées ou flexibles sont représentées en pointillés (**Zeke et al., 2016**). (B) Structure tridimensionnelle du domaine kinase du complexe JNK1 avec un motif de *docking* provenant de NFAT4 (PDB ID 2XRW) et une chaîne peptidique du substrat DYRK1A (PDB ID 2WO6). Les JNKs sont constituées d'un unique domaine kinase, un site de *docking* comprenant une région CD (*Common Docking site*) (en bleu), et un sillon hydrophobe de *docking* (en beige). Les résidus catalytiques (en rose) sont localisés de l'autre côté. L'insert CMGC (en orange) héberge une surface de *docking* appelée le site FxFP (**Zeke et al., 2016**).

Il est important de noter que tous les domaines structuraux ont été déterminés dans des formes non phosphorylées et donc inactives de JNK. L'absence de phosphorylation est responsable de l'inactivation des JNKs car la kinase présente un mauvais alignement des résidus catalytiques, ainsi qu'une rotation relative des deux domaines et l'obstruction du site actif par la boucle d'activation. Par conséquent, lors de l'activation par phosphorylation la structure protéique subit d'importants changements conformationnels (**Zeke et al., 2016**).

Les séquences et les structures des trois JNKs sont similaires. Les différences peptidiques dans le domaine kinase indiquent que JNK2 est le membre le plus ancien

(Manning *et al.*, 2002). Par ailleurs, JNK1 et JNK3 se ressemblent, mais la partie N-terminale de JNK3 peut s'allonger via l'utilisation d'un site d'initiation de la traduction en amont (Gupta *et al.*, 1996 ; cf. Figure 125).

E - Les homologues des JNKs

Les composants de la voie des JNKs sont conservés parmi les espèces (cf. Tableau 12). La plupart des animaux non vertébrés ne possèdent qu'un seul gène JNK, comme, par exemple le gène *Basket* chez la drosophile codant la protéine DJNK (Sluss *et al.*, 1996). Chez la drosophile, DJNK est l'homologue de JNK chez les mammifères. Cette kinase est activée et phosphorylée par HEP (homologue de la MAP2K chez la drosophile) et les substrats de DJNK sont des facteurs de transcription, tel que DJun. La voie de signalisation de DJNK est impliquée *in vivo* dans la réponse immunitaire et la morphogénèse (Sluss *et al.*, 1996). La structure cristalline de DJNK a été élucidée récemment et a permis de montrer que son repliement tridimensionnel est similaire à celui des isoformes de JNK chez les mammifères, démontrant une conservation des caractéristiques structurales et des fonctions pendant l'évolution (Chimnaronk *et al.*, 2015).

Espèces	Homologues des JNKs (gène homologue)	Références
Chez la drosophile (<i>Drosophila melanogaster</i>)	DJNK (<i>Basket</i>)	Sluss <i>et al.</i> , 1996
Chez le vers (<i>Caenorhabditis elegans</i>)	JNK-1 (<i>jnk-1</i>)	Kawasaki <i>et al.</i> , 1999
Chez la levure (<i>Saccharomyces cerevisiae</i>)	Hog1 (<i>hog1</i>)	Maeda <i>et al.</i> , 1995 ; Sprague, 1998

Tableau 12 : Regroupement des protéines homologues à JNK avec leurs gènes chez la drosophile (*D. melanogaster*), le nématode (*C. elegans*) et la levure de bière (*S. cerevisiae*).

F - Substrats des JNKs

Les JNKs phosphorylent directement une grande variété de substrats (cf. Tableau 13) au niveau d'un motif SP ou TP extrêmement commun dans toutes les protéines.

Une partie de leur spécificité vient de leur motif D (*Docking*) qui joue un rôle clé dans le recrutement de leurs substrats. Celui-ci localisé dans le domaine kinase de JNK, consiste en une région CD chargée négativement et un sillon hydrophobe (cf. Figure 127-B). La structure primaire du motif D correspond à une petite séquence linéaire d'environ 9 à 18 acides aminés trouvés dans les segments désordonnés en N-terminal de la kinase (Garai *et al.*, 2012). Le motif D est aussi utilisé pour recruter les kinases activatrices des JNKs (les MAP2Ks) qui sont responsables de la phosphorylation de la boucle d'activation de JNK. De plus, le même motif de *docking* est utilisé pour interagir avec les phosphatases qui déphosphorylent les résidus phosphorylés dans la boucle d'activation des JNKs, ainsi que d'autres protéines impliquées dans la régulation de la voie de signalisation, comme les protéines d'échafaudages JIP. Les motifs D sont variables, mais les motifs de *docking* des JNKs sont souvent spécifiques et se distinguent des autres motifs de *docking* qui ciblent les autres MAPKs. Par exemple, il peut y avoir un chevauchement entre les substrats de p38 et d'ERKs, mais pas avec ceux des JNKs (Garai *et al.*, 2012).

Les substrats des JNKs possèdent des séquences peptidiques s'associant aux motifs D des kinases, assurant *in fine* l'interaction des JNKs avec leurs substrats. Celles-ci peuvent être

séparés en deux groupes en fonction de leur structure ; le groupe des séquences D ressemblant à celle dans JIP1 ou le groupe des séquences D ressemblant à celle décrite dans le facteur de transcription NFAT4 (Garai *et al.*, 2012 ; cf. Figure 128). Ces deux séquences dans les substrats interagissent avec la même région de *docking* dans les JNKs, mais structurellement elles ne sont pas équivalentes du fait de différences dans le positionnement relatif de leurs résidus hydrophobes et chargés.

Plusieurs nouveaux substrats des JNKs ont été identifiés à partir de leur interaction avec le motif D des JNKs (Whisenant *et al.*, 2010).

JIP1-type consensus	NFAT4-type consensus
Symbolic: $\theta - \varphi_L - x - x - \varphi_A - x - \varphi_B$	Symbolic: $\theta - x - x - \varphi_L - x - \varphi_A - x - \varphi_B$
Regular: [RK]-P-[[^] P]-[[^] P]-L-x-[LIVMF]	Regular: [RK]-[[^] P]-[[^] P]-[LIM]-x-L-x-[LIVMF]

Figure 128 : Les deux classes principales de séquences peptidiques de *docking* dans les substrats des JNKs, interagissant avec les motifs D des kinases (d'après Zeke *et al.*, 2016).

La plupart des substrats des JNKs utilisent leurs motifs D afin d'interagir avec les kinases (cf. Tableau 13). Cependant, en plus des motifs D localisés dans les régions flexibles de la kinase, d'autres modes alternatifs d'interaction sont possibles. Par exemple, les substrats des JNKs peuvent être recrutés par JNK via son site FxFP. Ce site assure notamment, l'interaction directe entre JNK1 et une phosphatase, MKP7. Néanmoins, beaucoup de substrats des JNKs ne possèdent pas les séquences de *docking* classiques, permettant leur liaison aux kinases via les motifs D des JNKs, dont nous avons parlé précédemment. Par conséquent, ces substrats forment des complexes entre eux ou avec d'autres protéines qui possèdent les séquences de liaison aux JNKs. Dans ce cas, les substrats sont dit indirects (Zeke *et al.*, 2016 ; cf. Figure 129).

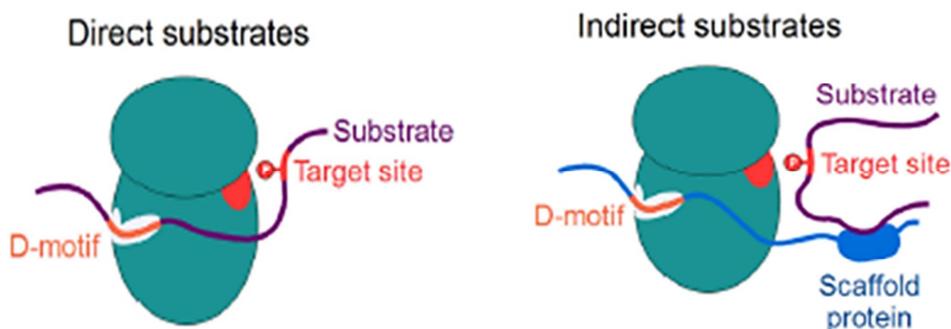


Figure 129 : Interaction entre les substrats et les JNKs via le motif D de la kinase. Les substrats interagissent, soit directement du fait d'une reconnaissance entre leur séquence linéaire et le motif D de la kinase (à gauche), soit indirectement en s'associant à une troisième protéine (*scaffold protein*) contenant la séquence linéaire d'interaction avec le motif D de JNK (à droite) (d'après Zeke *et al.*, 2016).

Finalement, la spécificité des JNKs pour leurs sites de phosphorylation dépend principalement du ciblage d'une Ser ou Thr suivie d'une Pro (Sheridan *et al.*, 2008). Cependant, JNK2 est moins sélective pour le site de phosphorylation qu'ERK2 ou p38 α , qui préfèrent un motif P-X-[S/T]-P (Sheridan *et al.*, 2008). De plus, il est important de noter que comme les autres MAPKs, les JNKs peuvent phosphoryler, mais à des taux plus faibles que

les sites SP/TP les sites SA, TA, SS, TS, ST, TT, SG ou TG (où l'acide aminé phosphorylé est souligné) (Sheridan *et al.*, 2008 ; Zeke *et al.*, 2016).

Les substrats identifiés des JNKs sont des protéines nucléaires (facteurs de transcriptions, comme, par exemple c-Jun, ATF2, c-Myc, Elk1...), des protéines membranaires (récepteurs), mais aussi des protéines cytosoliques (kinases, protéines d'échafaudages (JIP1, JIP2), protéines du cytosquelette, protéines mitochondriales contrôlant l'apoptose, comme, par exemple MCL1 ou Bim...). Ces substrats sont classés en 10 groupes protéiques (Zeke *et al.*, 2016 ; cf. **Tableau 13**).

Groupes protéiques fonctionnels	Nom des protéines	Type de séquence D	Groupes protéiques fonctionnels	Nom des protéines	Type de séquence D	
1- Protéines impliquées dans la transcription, de l'ADN et de la régulation des chromatines	ATF2	B	4- (suite) Protéines impliquées dans la phosphorylation et la déphosphorylation	DUSP8 (M3/6)	D	
	Beta-catenin	D		S6K (p70 ^{RSK})	D	
	c-Jun	B		Cdc25B/C	D/D	
	Cdt1	D		Raptor	D	
	Elk1/3/4	A/C/C		14-3-3- ζ/σ	D/D	
	FOXO3/4	D/D		MST1	D	
	Gli1/3	C/C		RSK	D	
	Hes1	D		5- Diverses protéines d'échafaudages et adaptatrices	DLG4 (PSD-95)	D
	HSF1	B			eIF4ET	D
	JDP2	D			IRS1/2	A/A
	JunD	B	Paxillin		D	
	c-Myc	D	Shc1		D	
	NFAT1 (NFATc2)	D	LIMD1		D	
	NFAT2 (NFATc1)	D	6- Autres protéines des systèmes de signalisation	cPLA ₂	D	
	NFAT4	B		DATI (SLC6A3))	D	
	NF-E2	D		eNOS	D	
	Nrl	D		ITCH	D	
	p53	D		Rad18	D	
	p73	D		Aquaporin-2	D	
	RRN3 (TIF1A)	D		CDKN1B (p27Kip1)	D	
Sirtuin	D	(SMPD2)		D		
Smad2/3	D/D	7- Protéines du cytosquelette		Cytokeratin-8	D	
Sp1	D			DCX (MAP)	B	
STAT1/3	D/D		MAP2 (MAP)	D		
Twist1	D		MARCKSL1	D		
YAP1	D		SMTL2	A		
POU6F1 (TCF- β 1)	D		Stathmin 1 (MAP)	C		
Histone H3.1	D		Stathmin 2 (SCG10)	C		
Runx2	D		Stathmin 3 (SCLIP)	D		
2- Protéines assurant la traduction et l'épissage des ARNm	DCP1a		D	Tau (MAP)	D	
	eEF1 α 2		D	WDR62 (MAP)	B	
	hnRNPK	C	KIF5C (kinésine)	D		
	SP45	D	Moesin	D		
	AIMP1	D	MAP1B	D		
3- Récepteurs et senseurs	Récepteur des androgènes	D	8- Protéines impliquées dans le transport des vésicules	APLP2	D	
	Récepteurs des glucocorticoïdes	D		β -APP	D	
	GluR2/4	D/D	JIP1/3	A/A		
	LRP6	D	Synaptotagmin 4	D		
	LSR (angulin)	D	9- Protéines mitochondriales contrôlant l'apoptose	Bad	D	
	Nur77	D		Bax	D	
	PPAR γ	D		Bcl2	D	
	RAR α	D		Bim	D	
	RXR α	D		Mcl1	A	
	SREBP1	D		Noxa (PMAIP)	D	
4- (début)	Akt1	D		Bid	D	
	DLK	D		SMAC (Diablo)	D	
			10- Inconnue	Sab (<i>Diablo</i>)	A	

Tableau 13 : Rassemblement des différents substrats (23) identifiés des JNKs dans dix groupes protéiques en fonction de leur caractéristiques et identification du type de séquence de liaison au motif de *docking* (D) de JNK : A (site *JIP1-like*), B (site *NFAT-like*), C et D (site atypique et non caractérisé) (d'après Zeke *et al.*, 2016).

F1 – Quelques exemple de substrats

Le facteur de transcription c-Jun, est le premier substrat qui a été identifié pour JNK activée par des irradiations UV (**Dérijard et al., 1994**) et c'est le mieux caractérisé. La kinase phosphoryla indépendamment les Ser63 et 73, ainsi que les Thr91, 93 et 95 dans le domaine d'activation de c-Jun (**Dérijard et al., 1994** ; **Reddy et al., 2013**). Les multiple-phosphorylations (Thr91, 93 et 95) sont retrouvées lors de la mort des neurones car elles agissent comme un amplificateur de la sensibilité de la cascade des JNKs à la voie c-Jun/AP-1 (*Activator Protein 1*) induisant des gènes pro-apoptotiques (**Reddy et al., 2013**).

Concernant les JIPs, JNK phosphoryle la Thr103 de JIP1 (**Nihalani et al., 2003**) et les Thr266, 276 et 287 de JIP3 (**Kelkar et al., 2000**). Ces phosphorylations sont nécessaires pour l'activation de la kinase et régulent son association avec ses partenaires, dont les protéines d'échafaudages elles-mêmes (**Nihalani et al., 2003** ; **Kelkar et al., 2000**).

F2 – Substrats des JNKs associés aux microtubules

Parmi tous les substrats connus des JNKs, sept sont des MAPs. On retrouve la doublecortine (DCX), MAP2, MAP1B, Tau, WDR62, et les Stathmines 1, 2 et 3, ainsi qu'une MAP motrice, la kinésine KIF5C. Cependant, seulement quelques-unes de ces protéines possèdent une séquence de liaison à JNK (par exemple, WDR62 ou DCX qui ont des séquences D *NFAT-like*). Les autres substrats (par exemple, MAP2 ou Tau) semblent phosphorylées grâce à leur proximité spatiale avec la voie des JNKs (**Zeke et al., 2016** ; cf. **Tableaux 13 et 14**).

Noms des MAPs	Références
DCX (<i>Doublecortin</i>)	Gdalyahu et al., 2004 ; Reiner et al., 2004 ; Jin et al., 2010 ; Singh et al., 2012
MAP2	Chang et al., 2003 ; Komulainen et al., 2014
MAP1B	Kawauchi et al., 2005
Stathmin 1, 2 (SG10), 3 (SCLIP)	Tararuk et al., 2006 ; Yip et al., 2014
Tau	Buée et al., 2000 ; Buée-Scherrer and Goedert, 2002 ; Chang et al., 2003 ; Yoshida et al., 2004 ; Ploia et al., 2011
WDR62 (<i>WD40-repeat protein 62</i>)	Bogoyevitch et al., 2012 ; Lim et al., 2015
KIF5C	Morfini et al., 2009

Tableau 14 : Les MAPs neuronales substrats des JNKs (d'après **Zeke et al., 2016** ; **Marchisella et al., 2016**).

Les protéines MAP2 et Tau sont parmi les premiers substrats des MAPKs découverts et sont extrêmement modifiés *in vivo* par JNK au niveau de nombreux sites conservés (**Chang et al., 2003**). Dans les neurones, la phosphorylation de ces MAPs par JNK module la dynamique des MTs (cf. **page 204**).

G - Fonctions physiologiques des JNKs

Beaucoup d'études se sont intéressées à découvrir les rôles physiologiques spécifiques des JNKs. Ces études ont établi que les JNKs régulent de nombreux processus biologiques, tels que le développement embryonnaire, les fonctions neuronales, la mort cellulaire (apoptose) mais aussi la prolifération et la survie cellulaire, le système immunitaire et l'inflammation (cf. **Tableau 15**). La multiplicité d'action des JNKs s'explique du fait du nombre important et de la diversité de leurs substrats (**Bode and Dong, 2007** ; **Zeke et al., 2016**).

Cependant, parmi les fonctions biologiques des JNK, certaines sont opposées, comme la survie et la mort cellulaire (**Bode and Dong, 2007 ; Solinas and Becattini, 2016 ; cf. Figure 131**), mais originellement JNK a été identifiée comme ayant un rôle dans l'apoptose dans des cellules PC12 carencées (**Xia et al., 1995**).

Fonctions	Notes	Références
Développement embryonnaire et fonctions neuronales	Développement et régénération neuronale Contrôle de l'apoptose et la nécrose neuronale	Kuan et al., 1999 ; Chang et al., 2003 ; Coffey, 2014 ; Muthaiah et al., 2017
Mort cellulaire (apoptose)	Régulation des facteurs pro-apoptotiques	Xia et al., 1995 ; Tournier et al., 2000 ; Lei and Davis, 2003 ; Gong et al., 2015 ; Solinas and Becattini, 2016
Prolifération et survie cellulaire (cycle cellulaire)	Régulation des facteurs anti-apoptotiques Augmentation de l'expression et activation des cyclines	Sabapathy et al., 2004 ; Lee and Song, 2008 ; Gutierrez et al., 2010 ; Zhang et al., 2015 ; Gong et al., 2015 ; Solinas and Becattini, 2016
Immunité (inflammation)	Différentiation et activation des lymphocytes T	Dong et al., 1998 ; Yang et al., 1998
Adhésion et migration cellulaire	Formation des jonctions cellulaires	Huang et al., 2003 ; You et al., 2013
Métabolisme	Contrôle de la sensibilité, de la production et de la résistance à l'insuline	Manieri and Sabio, 2015

Tableau 15 : Principales fonctions physiologiques des JNKs (d'après **Bode and Dong, 2007 ; Weston and Davis, 2007 ; Kumar et al., 2015 ; Kim and Choi, 2015 ; Zeke et al., 2016 ; Hotamisligil and Davis, 2016**).

G1 – Quelques exemples de fonctions physiologiques des JNKs

Dans une étude, le rôle des JNKs dans le développement embryonnaire du cerveau a été montré chez des souris KO pour un ou plusieurs gène(s) codant les kinases. Les auteurs ont montré qu'une simple délétion ($JNK1^{-/-}$, ou $JNK2^{-/-}$, ou $JNK3^{-/-}$) est viable, tandis que les souris ayant subi une double-délétion ($JNK2$ et $JNK3^{-/-}$, ou $JNK1$ et $JNK2^{-/-}$) meurent tôt lors du développement embryonnaire du fait d'importants défauts neurologiques (**Kuan et al., 1999**).

Chez les adultes, le cerveau est le site où l'expression de JNK est la plus importante, et la délétion d'un seul gène cause des défauts dans le système nerveux central. L'activité normale de JNK est impliquée dans le développement et la régénération du cerveau, mais une sur-activation de JNK peut induire l'apoptose des neurones (**Zeke et al., 2016**).

Les JNKs ont aussi un rôle clé dans la division cellulaire, en régulant plus particulièrement les phases du cycle cellulaire, cependant tous les mécanismes précis d'action ne sont pas encore bien élucidés. La kinase JNK participe à la progression de la phase G1 en agissant notamment sur l'expression de la cycline D1, elle intervient également dans le déroulement de la phase S et est aussi impliquée dans la transition G2/M (**Zhang et al., 2015 ; cf. Figure 130**). Lors de cette transition, JNK participe au bon déroulement du point de contrôle G2 en inhibant Cdk1 (**Gutierrez et al., 2010 ; cf. Figure 130**) et participe au début de la phase M en assurant un rôle lors de la condensation des chromosomes (**Lee and Song, 2008 ; cf. Figure 130**).

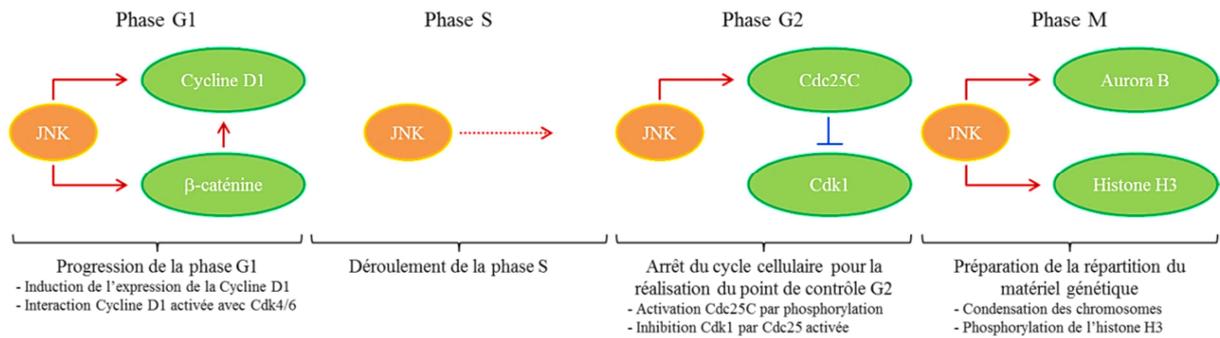


Figure 130 : Rôles de JNK lors de la prolifération et la survie au cours du cycle cellulaire (d'après **Lee and Song, 2008 ; Gutierrez et al., 2010 ; Zhang et al., 2015**).

En plus de son implication dans la division cellulaire, JNK est aussi impliquée dans la prolifération et la survie, ainsi que dans la mort cellulaire. Néanmoins, son rôle n'est pas encore complètement élucidé et reste très contradictoire. Par exemple, une étude a montré que JNK1 est impliqué dans la prolifération cellulaire en régulant positivement son substrat de la voie des facteurs de transcription c-Jun/AP-1 (**Sabapathy et al., 2004**), tandis qu'une autre étude a montré que JNK1 joue un rôle dans l'induction de l'apoptose via plusieurs activateurs, comme le TNF α ou les ROS (**Tournier et al., 2000 ; cf. Figure 131**). Une autre étude a mis en évidence de nouveau l'ambiguïté des réponses biologiques médiées par JNK. En effet, lors d'une activation basale, JNK peut induire un signal prolifératif ; au contraire, lors d'une activation plus soutenue de JNK un signal antiprolifératif est induit, respectivement en inhibant ou activant CDK1 (**Ventura et al., 2006 ; Gong et al., 2015 ; Solinas and Becattini, 2016 ; cf. Figure 131**).

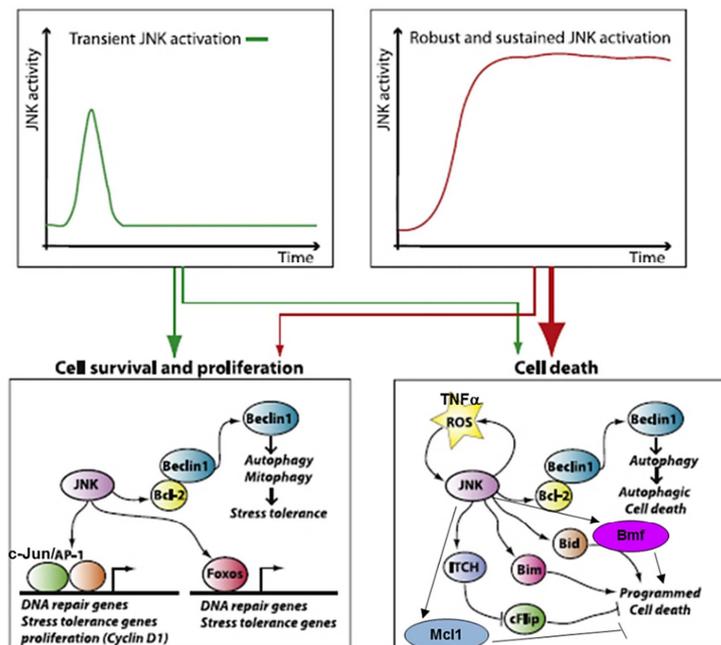


Figure 131 : Modèle général d'action de JNK dans les cellules en réponse au stress. Une variable importante pour l'orientation de la voie des JNKs est la durée et l'intensité de son activation (**Solinas and Becattini, 2016**).

La phosphorylation d'une thréonine par JNK dans Bim est à l'origine de la destruction de l'interaction entre Bim et la dynéine qui séquestre Bim sur les MTs (**Lei and Davis, 2003**). Le même mécanisme de régulation, dépendant de la phosphorylation est retrouvé pour une

protéine similaire à Bim, soit Bmf. En effet, la phosphorylation de cette dernière par JNK détruit l'interaction de Bmf avec la myosine V qui séquestre Bmf sur le cytosquelette d'actine (Lei and Davis, 2003). Ainsi, JNK favorise la voie apoptotique en sur-exprimant les protéines pro-apoptotiques Bim et Bmf, mais aussi en dégradant la protéine anti-apoptotique Mcl1 (Lei and Davis, 2003 ; Weston and Davis, 2007 ; Hotamisligil and Davis, 2016 ; Solinas and Becattini, 2016 ; cf. Figure 131).

Les JNKs peuvent aussi favoriser l'autophagie en phosphorylant Bcl2 et Bcl-xl, ce qui induit la libération de Beclin1 (Sui et al., 2014 ; Solinas and Becattini, 2016 ; cf. Figure 131).

D'autres travaux ont montré que les JNKs sont également impliquées dans l'inflammation et l'immunité. En effet, des souris KO pour JNK1 (*JNK1^{-/-}*) présentent un défaut de différenciation des lymphocytes T en Th2 (Dong et al., 1998), et des souris déficientes pour JNK2 (*JNK2^{-/-}*) ont un défaut de différenciation des lymphocytes T en Th1 (Yang et al., 1998). De plus, les auteurs ont mis en évidence d'autres anomalies chez ces souris *JNK2^{-/-}*, comme un défaut d'activation, de prolifération et de sécrétion de l'IL-2 par les lymphocytes T périphériques. Ainsi, cela montre que JNK2 a un rôle important dans l'immunité en assurant la maturation des lymphocytes T et l'activation des lymphocytes T périphériques (Yang et al., 1998).

H – Implications des JNKs dans des maladies humaines

L'activité des JNKs est retrouvée associée à beaucoup de maladies humaines car ces kinases ont une grande diversité de substrats et de fonctions physiologiques. Dans ce sens, différentes études ont montré que les JNKs sont impliquées dans certaines étapes du développement des pathologies, comme la résistance à l'insuline dans le diabète et l'obésité, ou encore la transformation oncogénique dans le cancer... (Zeke et al., 2016 ; cf. Tableau 16). Dans la plupart de ces maladies l'activité des JNKs est dérégulée, elle est souvent augmentée (Sabapathy, 2012).

Maladies	Notes	Références
Diabète de type II	Résistance à l'insuline	Hirosumi et al., 2002 ; Manieri and Sabio, 2015 ; Solinas and Becattini, 2016 ; Pal et al., 2016
Obésité	Dérèglement métabolique	
	Augmentation de la sécrétion de cytokines conduisant à une inflammation chronique	
Cancer	Contrôle des gènes pro-oncogénique et suppresseur de tumeurs	Wang et al., 2010 ; Nitta et al., 2011 ; Tournier, 2013 ; Bubici and Papa, 2014 . Wang et al., 2015 ; Zhao et al., 2015 ; Kang et al., 2017
	Défauts de réparation de l'ADN. Défauts de la progression du cycle cellulaire	
Maladies neurologiques (Alzheimer, Parkinson, épilepsie, Huntington...)	Augmentation des signaux apoptotiques	Coffey, 2014 ; Yarza et al., 2016
Asthme, Polyarthrite rhumatoïde	Inflammation allergique accrue	Khorasanizadeh et al., 2017
Accident vasculaire cérébral (AVC), Infarctus cardiaque	Blessure tissulaire, ischémie	Coffey, 2014

Tableau 16 : La voie de signalisation des JNKs est impliquée dans de multiples maladies en fonction des rôles physiologiques des JNKs (d'après Bode and Dong, 2007 ; Weston and Davis, 2007 ; Sabapathy, 2012 ; Kim and Choi, 2015 ; Kumar et al., 2015 ; Zeke et al., 2016 ; Hotamisligil and Davis, 2016).

H1 – Quelques exemple de fonctions pathologiques des JNKs

L'expression et les fonctions des JNKs sont dérégulées dans divers cancers humains (**Sabapathy, 2012** ; cf. **Figure 132**). Différentes études ont même montré qu'il y a une corrélation entre l'activité élevée de JNK et un mauvais pronostic clinique, incluant le cancer du sein (**Tournier, 2013**), mais aussi le cancer du cerveau, les leucémies, les lymphomes et les myélomes multiples (**Zhao et al., 2015**). Cependant, le rôle suppresseur de tumeur ou oncoquinase de JNK dans l'oncogenèse reste ambiguë (**Bubici and Papa, 2014**).

Dans le cancer du sein, il a été montré que l'hyper-activation de JNK augmente l'invasion et la survie des cellules cancéreuses en régulant l'activation de la voie de signalisation d'ERK (**Wang et al., 2010**). Une autre étude, dans le cancer du foie, a mis en évidence un lien direct entre JNK1 et ERK1 *in vivo* pendant la cancérogénèse. Cependant, cette fois-ci la surexpression d'ERK1, et non ERK2, supprime l'activité de JNK1 et ainsi la voie de signalisation Ras/JNK/cJun/AP-1 (**Kang et al., 2017**).

Par ailleurs, il a été montré que JNK2 α (une isoforme particulière de JNK) est retrouvée surexprimée dans la majorité des carcinomes pulmonaires NSCLC (*Non-Small Cell Lung Carcinoma*) et directement associée à la cancérogénèse. En effet, chez des souris dont l'expression de JNK2 α est diminuée, la formation tumorale et les phénotypes cancéreux associés sont réduits. Les auteurs ont identifié que JNK2 α induit la formation des NSCLC en régulant positivement l'activité de certains substrats oncogéniques par phosphorylation, comme c'est le cas pour STAT3 qui est phosphorylé sur la Ser727 (**Nitta et al., 2011**). Une activation soutenue de JNK peut donc favoriser la progression du cancer.

Dans le cancer la prolifération et la migration sont aussi dérégulées. Dans ce sens une étude a montré que la mucine-1 favorise la migration et l'invasion des cellules cancéreuses dans le carcinome hépatique via la phosphorylation de Smad2 dans sa partie C-terminale (Ser465 et 467) et ses régions centrales (Ser245, 250 et 255) par JNK (**Wang et al., 2015**). De plus, une autre étude a montré que JNK1 régule la migration des cellules en phosphorylant la paxilline (Ser178) (**Huang et al., 2003**).

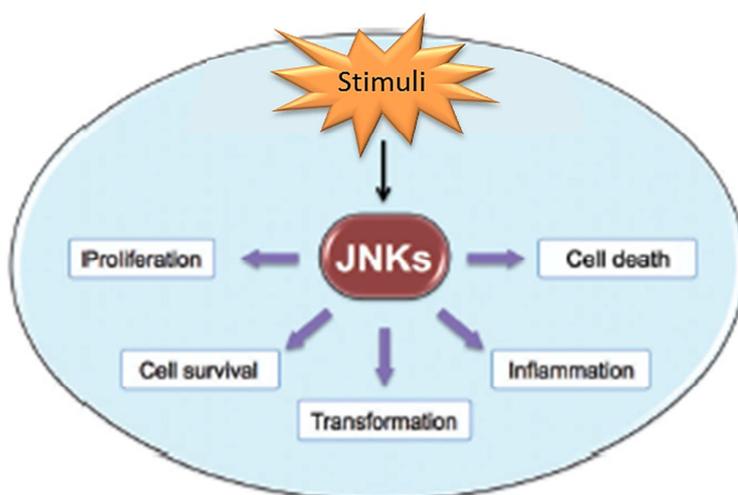


Figure 132 : Les JNKs sont impliquées dans le cancer via leurs activités cellulaires. Les kinases sont activées par divers stress extracellulaires et intracellulaires, comme des oncogènes (Ras, Myc...), l'alcool, l'obésité, des agents infectieux (virus ou bactéries), ou encore les radiations UV (d'après **Bubici and Papa, 2014**).

Dans les maladies neurodégénératives (Parkinson, Alzheimer ou Huntington), JNK est aussi impliquée.

Dans la maladie de Parkinson, le rôle de JNK n'est pas clairement établi, mais il serait lié à la mort des neurones dopaminergiques via l'activation de c-Jun (**Harper and Wilkie, 2003**). Dans ce sens, une autre étude sur un modèle de la maladie de Parkinson, confirme le rôle de JNK dans la mort des neurones dopaminergiques via l'activation de son facteur de transcription substrat, ATF2 en réponse à un stimulus pro-apoptotique (**Huang et al., 2016**).

Concernant, la maladie d'Alzheimer, JNK est associée à la formation des plaques séniles formés par l'agrégation des peptides de β -amyloïde, une neuro-inflammation, l'induction de l'apoptose et la dégénérescence neurofibrillaire intracellulaire via une hyperphosphorylation des protéines Tau (**Buée et al., 2000 ; Ploia et al., 2011 ; Yarza et al., 2016 ; cf. Figure 133 ; cf. page 204**).

Dans le cas de la maladie de Huntington, la majorité des études montrent que l'expression de JNK est augmentée (**Bowles and Jones, 2014**). Dans cette pathologie, il a été montré que la queue polyQ de la huntingtine inhibe le transport axonal via un mécanisme faisant intervenir l'activation de JNK et plus précisément via JNK3, l'isoforme spécifique du cerveau (**Morfini et al., 2009**).

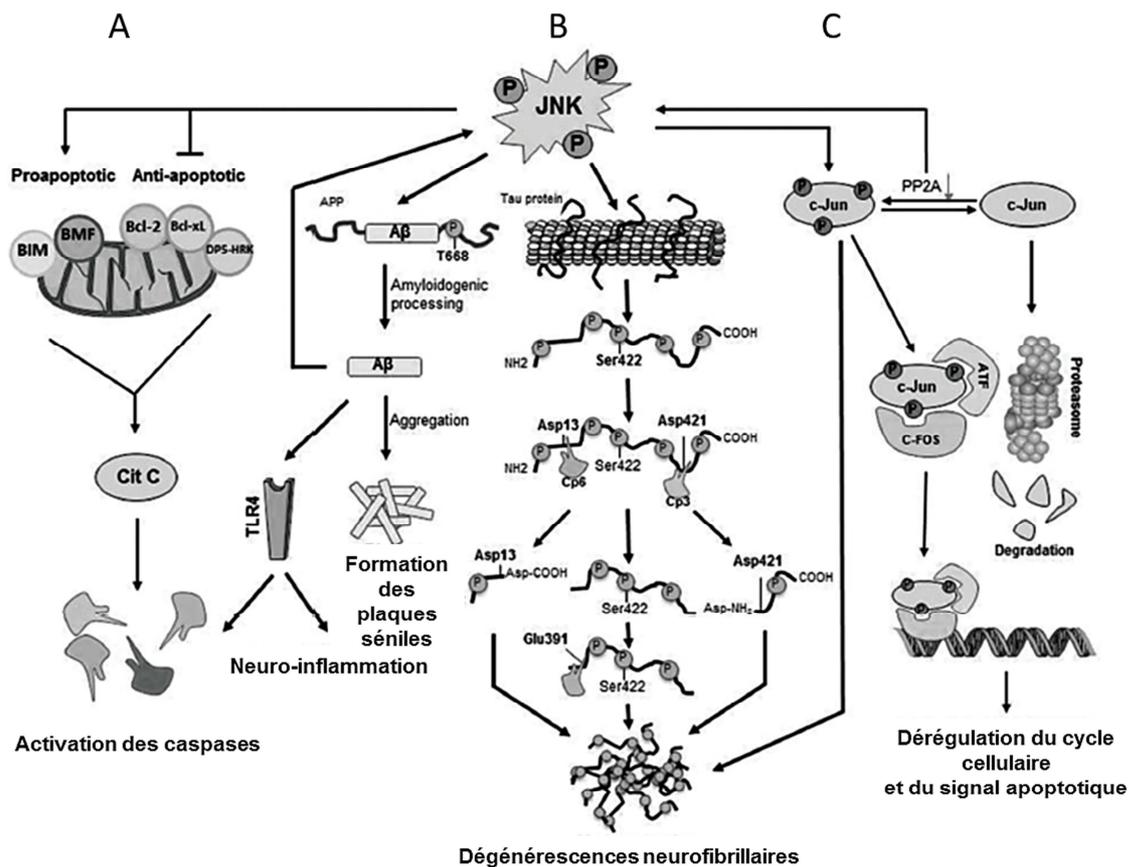


Figure 133 : Mécanismes cellulaires régulés par JNK dans la maladie d'Alzheimer. (A) JNK est responsable de la phosphorylation de facteurs pro- et anti-apoptotiques conduisant à l'activation des caspases. (B) JNK a un rôle direct dans la dégénérescence neurofibrillaire en phosphorylant Tau, ainsi qu'à la formation des plaques de β -amyloïde (A β), la neuro-inflammation et l'activation des caspases. (C) JNK phosphoryle son facteur de transcription substrat, c-Jun qui module l'expression des gènes et participe à la neuro-dégénérescence (d'après **Yarza et al., 2016**).

Les JNKs sont aussi des médiateurs cruciaux dans la physiopathologie de l'obésité et du diabète de type II. En effet, une augmentation de l'activité de JNK est retrouvée chez des patients obèses. Lors d'un régime riche en lipides, JNK agit au niveau du foie, des macrophages, de l'hypophyse antérieure et des adipocytes (**Hirosumi *et al.*, 2002 ; Manieri and Sabio, 2015 ; Pal *et al.*, 2016 ; Solinas and Becattini, 2016 ; cf. Figure 134**). L'activation de JNK transforme les macrophages en cellules pro-inflammatoires conduisant à une production accrue de cytokines pro-inflammatoires telles que le TNF α , l'IL-1 β et l'IL-6. Ces facteurs provoquent des troubles du métabolisme du glucose et la résistance à l'insuline. Cette dernière entraîne une hyperglycémie due à la diminution des capacités du foie à stocker le glucose, ce qui peut être à l'origine du développement du diabète de type II. De plus, la lipolyse du tissu adipeux induite par la voie JNK/IL-6 induit une augmentation de la glycémie (**Solinas and Becattini, 2016 ; Pal *et al.*, 2016 ; cf. Figure 134**).

Depuis plusieurs années, JNK est considérée comme une cible thérapeutique potentielle dans l'obésité et le diabète de type II (**Hirosumi *et al.*, 2002 ; Solinas and Becattini, 2016**). Dans ce sens, il a été montré que l'inhibition de JNK1/2 peut améliorer la sensibilité à l'insuline dans l'obésité (**Pal *et al.*, 2016**).

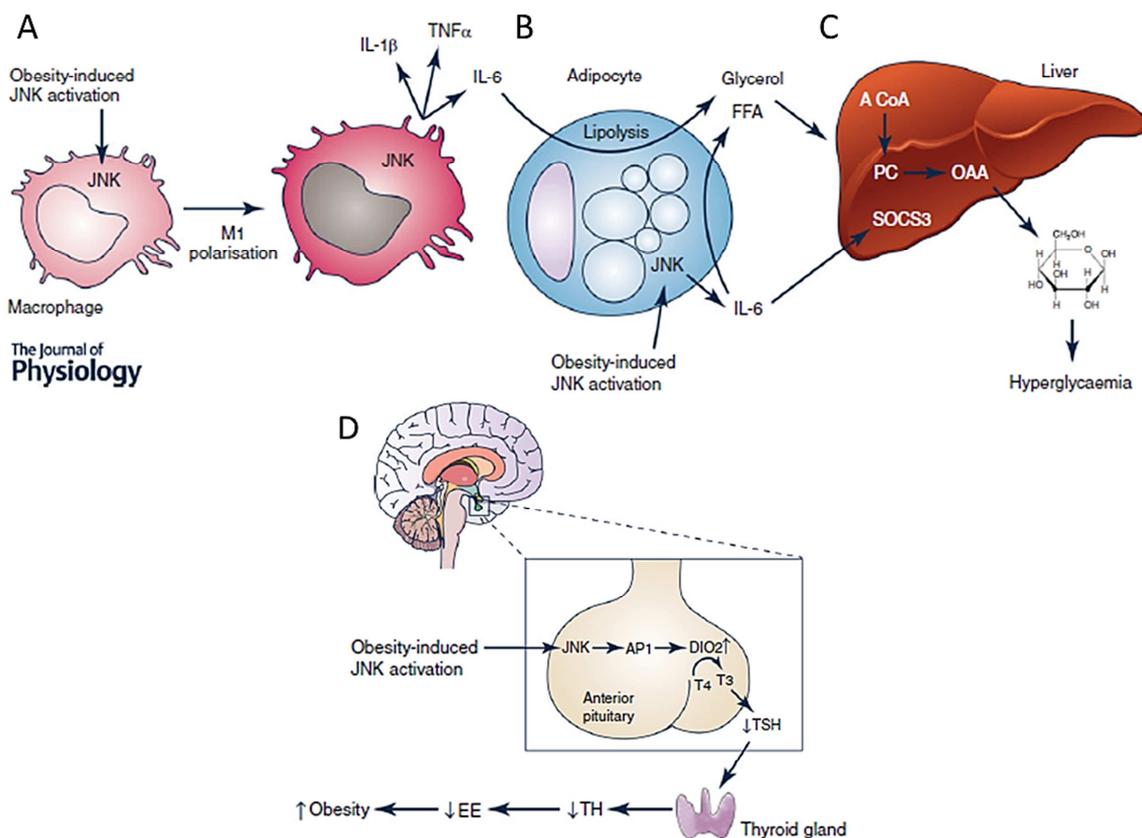


Figure 134 : Effets métaboliques de l'activation de JNK au cours du développement de l'obésité. (A) JNK joue un rôle important dans la polarisation des macrophages et la sécrétion par ces derniers de cytokines pro-inflammatoires. (B) Dans les adipocytes, la production d'IL-6 JNK-dépendante induit leur lipolyse. (C) Dans le foie, l'activation de SOCS3 par l'IL-6 conduit à une hyperglycémie et à la résistance à l'insuline. (D) Dans l'hypophyse, l'obésité active JNK, conduisant à l'activation d'AP-1 et du gène cible d'AP-1 : Dio2 (*type 2 iodothyronine deiodinase*). Ce dernier freine la production de TSH (*Thyroid-Stimulating Hormone*) et des hormones thyroïdiennes (TH), ce qui conduit *in fine* à une diminution des dépenses énergétiques (EE) et au développement de l'obésité (d'après **Pal *et al.*, 2016**).

I – JNK comme cible pharmacologique potentielle : comment inhiber JNK

La compréhension des fonctions physiologiques et pathologiques de la voie de signalisation JNK est importante pour pouvoir développer de nouvelles stratégies thérapeutiques innovantes. Dans ce sens, au cours des dernières années, plusieurs inhibiteurs sélectifs des JNK ont été développés (Gehring *et al.*, 2015 ; cf. **Figure 135**). Différentes études ont montré que l'inhibition de la voie de signalisation des JNKs est une nouvelle opportunité dans le traitement des cancers, mais aussi des maladies neurodégénératives où ces agents sont décrits comme étant des neuro-protecteurs, ou encore de l'obésité et du diabète de type II (Nitta *et al.*, 2010 ; Sabapathy, 2012 ; Coffey, 2014 ; Gehring *et al.*, 2015 ; Kumar *et al.*, 2015 ; Solinas and Becattini, 2016 ; Yarza *et al.*, 2016 ; Khorasanizadeh *et al.*, 2017).

En tout, 132 petites molécules inhibitrices sont dénombrées. Leur structure est dérivée des classes chimiques : pyrimidine, pyridine, thiophène, pyrazole, isoquinoline et piperazine. La plupart de ces molécules sont des inhibiteurs covalents des JNKs et sont utilisées dans le traitement des maladies impliquant JNK. Par exemple, les composés dérivés de la pyrimidine sont utilisés dans le traitement de l'asthme et de la polyarthrite rhumatoïde, tandis que les agents dérivés de la pyridine et du pyrazole sont plus efficaces dans les maladies neurodégénératives. De plus, les composés dérivés de l'isoquinoline sont de puissants inhibiteurs de JNK1/2 montrant des effets suppresseur de la croissance dans l'hypertrophie cardiaque (Kumar *et al.*, 2015).

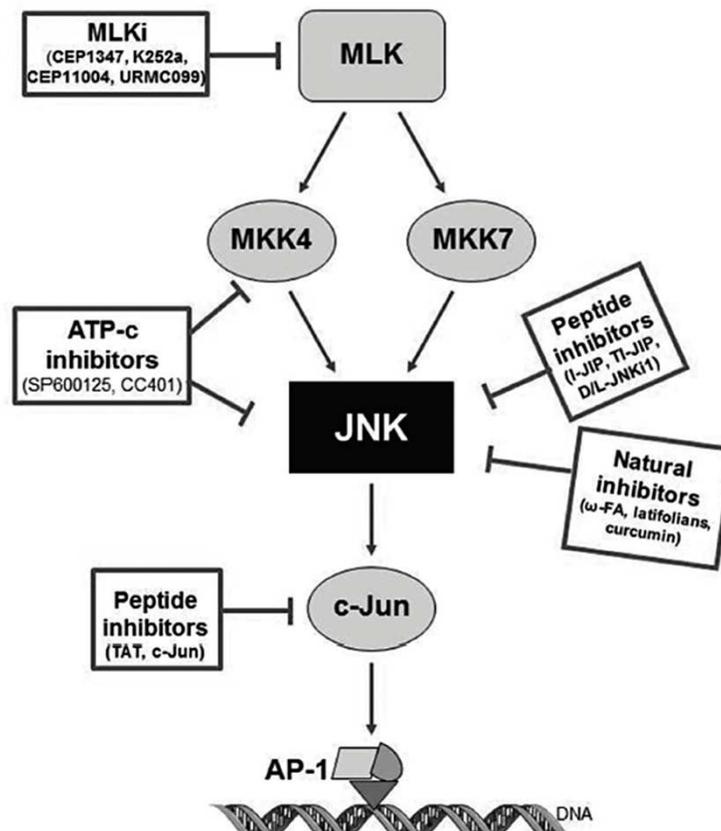


Figure 135 : Cible pharmacologique de certains inhibiteurs des JNKs (ATPc : inhibiteurs compétitifs de l'ATP ; MLKi : Mixed Linage Kinase inhibitors) (Yarza *et al.*, 2016).

Un exemple d'inhibiteur des JNKs communément utilisé en recherche est le SP600125 (anthra[1,9-cd]pyrazol-6(2H)-one) (cf. **Figures 117-B et 135**). Ce composé appartient à la classe des anthrapyrazolones et a été le premier inhibiteur spécifique des JNKs décrit. En effet, sa concentration inhibitrice à 50% (IC50) est de 0,04 μM pour JNK1 et JNK2 et 0,09 μM pour JNK3, tandis que pour les autres MAPKs (ERK et p38) l'IC50 est supérieure à 10 μM (**Bennett et al., 2001**). Néanmoins, le SP600125 montre une activité inhibitrice comparable envers d'autres kinases, comme, par exemple Aurora B et C (**Bain et al., 2007**). Plus précisément, le SP600125 est un inhibiteur compétitif de la liaison à l'ATP car il se lie au niveau du site de liaison de l'ATP sur les kinases (**Bennett et al., 2001**). Ce composé est décrit comme étant un puissant agent antinéoplasique (**Kumar et al., 2015**).

J – Implication de JNK dans la dynamique des microtubules via ses MAPs neuronales substrats

Nous avons vu que les JNKs ont des rôles importants dans le cerveau. En effet, elles sont essentielles pour le développement neuronal en régulant les changements morphologiques impliqués lors de la migration des cellules. De plus, dans le cerveau adulte, les JNKs participent à l'architecture des neurones (**Coffey, 2014**). Afin de découvrir les effecteurs moléculaires des JNKs dans ces événements, différentes études ont étudié des protéines interagissant avec les JNKs dans le cerveau et ont montré que les JNKs pouvaient influencer la stabilité des MTs via la phosphorylation des MAPs substrats (**Marchisella et al., 2016** ; cf. **Figure 136**).

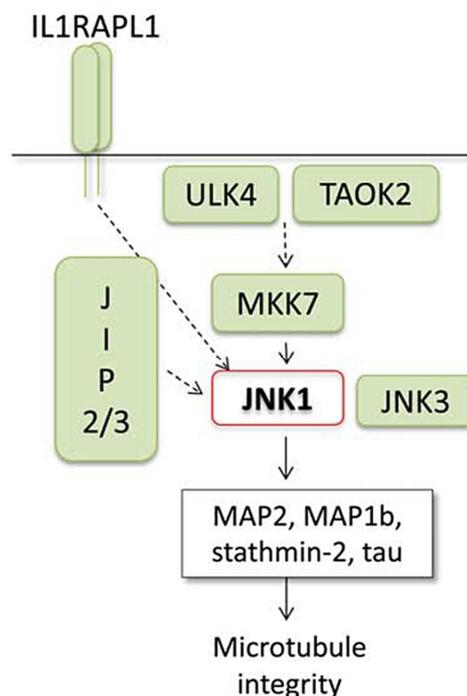


Figure 136 : Implication de JNK1 dans la stabilité des microtubules via ses MAPs substrats (d'après **Marchisella et al., 2016**).

La DCX, est une MAP stabilisatrice des MTs qui est essentielle pour la migration des neurones pendant le développement neuronal chez l'homme (**Fourniol et al., 2013**). Dans les neurones, cette protéine participe à la transduction du signal en interagissant avec d'autres

protéines et est régulée par phosphorylation. Sa localisation dans les neurones dépend de son interaction avec JIP1 et la kinésine conventionnelle (**Gdalyalu et al., 2004**). De plus, la DCX est capable de se lier directement à JNK (**Reiner et al., 2004**). La phosphorylation de la DCX dépend de diverses kinases, telles que Cdk5 (*Cyclin-dependent kinase5*) qui phosphoryle *in vitro* la Ser322 et *in vivo* la Ser297 (**Jin et al., 2010**), mais aussi GSK3 β (**Singh et al., 2012**). La DCX est également phosphorylée par JNK (**Gdalyalu et al., 2004 ; Reiner et al., 2004 ; Singh et al., 2012**), et *in vivo* il a été montré que cette kinase phosphoryle la Ser322 (**Jin et al., 2010**). Lorsque la DCX est phosphorylée par JNK, elle s'accumule dans les régions riches en actine dans les cônes de croissance des neurones, présente une altération de son affinité pour la tubuline (cf. **Figure 137**) et augmente la croissance des neurites et la mobilité neuronale (**Gdalyalu et al., 2004 ; Jin et al., 2010**). Une autre étude suggère également que les JNKs peuvent contrôler la migration des neurones via le positionnement de DCX dans leur voie de signalisation (**Reiner et al., 2004**). L'ensemble de ces données montre l'importance de la phosphorylation de la DCX par JNK pour assurer ses fonctions neuronales.

Concernant MAP2, elle est phosphorylée par JNK (**Chang et al., 2003**). Dans le cortex moteur des souris, il a été montré que JNK1 phosphoryle les Thr1619, 1622 et 1625 de MAP2, ce qui augmente sa liaison à la tubuline augmentant la stabilisation des MTs (**Komulainen et al., 2014 ; cf. Figure 137**). De plus, dans des conditions physiologiques, l'activité de JNK1 sur MAP2 permet de maintenir la longueur des MTs (**Chang et al., 2003**). En même temps, JNK1 contrôle l'architecture des dendrites, ainsi que le fonctionnement normal de la coordination motrice des souris (**Komulainen et al., 2014**). Ces données mettent en évidence l'implication majeure de la voie de signalisation des JNKs dans la morphologie neuronale et permettent de mieux comprendre les effets moléculaires de la destruction génétique de cette voie dans les maladies neuropsychiatriques.

D'autres MAPs sont des substrats de JNK, c'est le cas de MAP1B. La phosphorylation de MAP1B est observée pendant le développement et les maladies neuronales. Cette MAP est également phosphorylée par Cdk5. Cette kinase est impliquée dans la régulation de la dynamique des MTs lors de la migration neuronale, sans pour autant affecter le taux de phosphorylation de MAP1B. Ces données suggèrent que pendant le développement du cortex cérébral, la phosphorylation de MAP1B est facilitée par JNK, mais pas par Cdk5 et agit sur la dynamique des MTs (**Kawauchi et al., 2005 ; cf. Figure 137**).

Un autre substrat de JNK est la MAP Tau. Cette MAP est retrouvée hyper-phosphorylée dans la maladie d'Alzheimer. Cette hyper-phosphorylation des protéines Tau sur ces sites Ser/Thr est médiée en partie par JNK, pour les Ser202/Thr205 (**Ploia et al., 2011**) et la Ser422 (**Yoshida et al., 2004**), mais également par les autres MAPKs (ERK et p38) (**Buée-Scherrer and Goedert, 2002**). La phosphorylation a originellement été montrée pour inhiber la capacité de Tau à se lier aux MTs (**Yoshida et al., 2004 ; cf. Figure 137**), mais elle ne semble pas suffisante pour induire complètement la dissociation de Tau des MTs (**Ploia et al., 2011**). Les JNKs sont activées dans le cerveau de patients atteints de la maladie d'Alzheimer et sont associées au développement des plaques de β -amyloïde (**Buée et al., 2000 ; Ploia et al., 2011**).

Chez les vertébrés, JNK phosphoryle la Thr1053 de WDR62 (**Bogoyevitch et al., 2012**). Cette MAP est une protéine du fuseau mitotique intervenant dans le cycle cellulaire et le développement neuronal. Elle recrute spécifiquement JNK1 au niveau des MTs du fuseau mitotique pendant la métaphase et peut être impliquée dans la coordination de la neurogenèse (**Bogoyevitch et al., 2012**). Bien que l'association de JNK soit nécessaire pour réguler la mitose, l'association de WDR62 avec les MTs est négativement régulée par la phosphorylation médiée par JNK (**Lim et al., 2015**). Ces études définissent les mécanismes moléculaires impliquant la voie de signalisation de JNK qui régulent la localisation subcellulaire de WDR62 (**Bogoyevitch et al., 2012 ; Lim et al., 2015**).

Dans la famille des stathmines, les stathmines 1, 2 (aussi appelée SCG10) et 3 (aussi appelée SCLIP) sont des substrats de JNK. Ce sont des phosphoprotéines, ainsi que des régulateurs clés de la dynamique et de l'organisation des MTs dans les cellules en interphase. Il a été montré qu'*in vivo* les stathmines interagissent étroitement avec JNK (**Tararuk et al., 2006**) et sont phosphorylées par cette kinase sur deux sérines conservées (25 et 38) qui sont entourées de résidus proline, sachant que la Ser38 est le premier site de phosphorylation que cible JNK. Ces résidus sont également phosphorylés par PI3K (*PhosphoInositide 3-Kinase*) et les Cdks (*Cyclin-dependent kinases*) (**Machado et al., 2014**). Ces phosphorylations diminuent leur activité déstabilisatrice des MTs, en réduisant la séquestration des hétérodimères d' α/β -tubulines (**Machado et al., 2014 ; cf. Figure 137**) De plus, *in vivo* SCG10 est également phosphorylée par JNK sur les sérines 62 et 73. Cette phosphorylation de SCG10 détermine l'élongation des neurites et la migration des neurones pendant le développement neuronal (**Tararuk et al., 2006 ; Yip et al., 2014**). En revanche, la stathmine 3 est phosphorylée par JNK sur la Ser60 qui correspond à la Ser25 pour les deux autres stathmines. Ainsi, les stathmines 1 et 2 sont similairement ciblées par JNK, tandis que, la stathmine 3 est différemment reconnue et phosphorylée par JNK (**Yip et al., 2014**).

Concernant la kinésine-1 KIF5C, ses chaînes lourdes sont phosphorylées par JNK (**Morfini et al., 2006**). Par spectrométrie de masse un résidu dans le domaine moteur de la kinésine-1 a été identifié comme étant phosphorylé par JNK3. La phosphorylation de la kinésine-1 inhibe sa liaison avec les MTs (cf. **Figure 137**). Comme JNK3 est un médiateur de la toxicité de la queue polyQ de la huntingtine dans la maladie de Huntington, ces données apportent des bases moléculaires pouvant expliquer l'inhibition du transport axonal dans cette pathologie via la queue polyQ de la huntingtine et la voie de signalisation de JNK (**Morfini et al., 2009**).

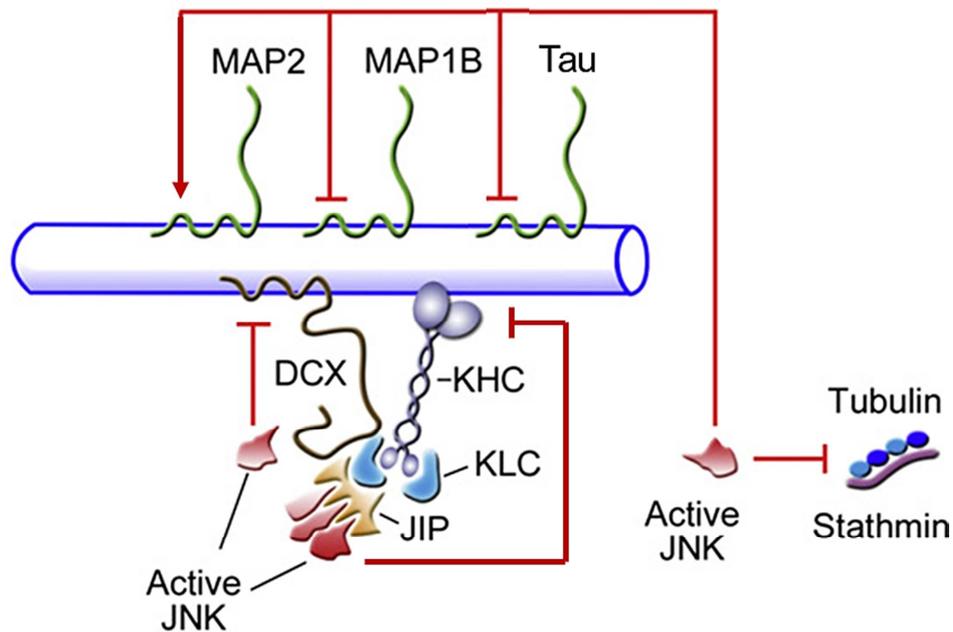


Figure 137 : Contrôle et organisation de la dynamique des microtubules par la voie Kinesine-1/JIP/JNK. Lorsque certaines MAPs stabilisatrices (MAP1B, Tau, DCX), ainsi que le moteur moléculaire (kinésine-1) sont phosphorylées par JNK, les MTs sont déstabilisés (d'après **Daire and Poüs, 2011**).

III – Implication de JNK dans la dynamique des microtubules dans les cellules épithéliales

Précédemment, au laboratoire, il a été montré que la kinase de stress JNK module plusieurs aspects de la dynamique des MTs dans les cellules épithéliales (**Daire et al., 2009**). Cependant, alors que les substrats de JNK capables de réguler la dynamique des MTs sont pour l'essentiel des MAPs spécifiquement neuronales, leurs équivalents dans les cellules épithéliales restent encore à découvrir.

A – Localisation aux microtubules : implication du complexe kinésine-1/JIP1

Dans les cellules épithéliales, les JNKs sont recrutées près des MTs et rapprochées de leurs kinases activatrices en amont, grâce au complexe kinésine-1/JIP1. En effet, JIP1 interagit directement avec les chaînes légères de la kinésine-1 (KLC) et est transportée par ce moteur moléculaire (**Verhey et al., 2001**). De plus, les JIPs (JIP1, JIP2, JIP3) sont des protéines d'échafaudage qui augmentent l'activation de JNK, de par leur interaction avec ses kinases activatrices en amont de la voie (les MAP3Ks et les MAP2Ks) (**Davis, 2000** ; **Kukekov et al., 2006**). Ainsi, ce recrutement dépendant de la kinésine-1 permet localement la double phosphorylation et donc l'activation de JNK dans l'environnement microtubulaire (**Daire and Poüs, 2011** ; cf. **Figure 138**). Il est important de noter que l'hyper-acétylation de la lysine 40 de l' α -tubuline, augmente le recrutement de la kinésine-1 et de JIP1 sur les MTs (**Geeraert et al., 2010**).

Une fois formé, ce complexe kinésine-1/JIP1/JNK peut circuler le long des MTs via l'activité motrice de la kinésine-1. Il se dissocie lorsque la kinésine-1 et JIP1 sont phosphorylées par JNK. Effectivement, les chaînes lourdes de la kinésine-1 sont phosphorylées par JNK et cela permet la libération du moteur moléculaire des MTs (**Morfini et al., 2006 ; Morfini et al., 2009**). De même, JNK régule négativement son association avec les JIPs en les phosphorylant (**Kelkar et al., 2000 ; Nihalani et al., 2003**).

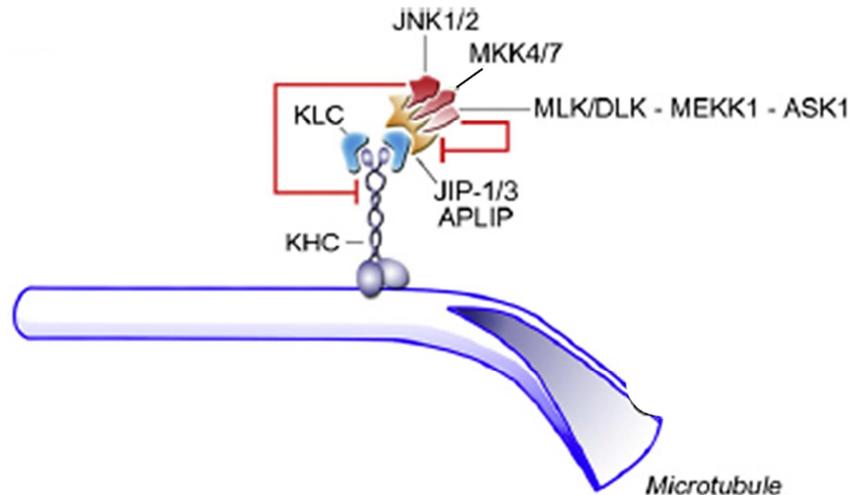
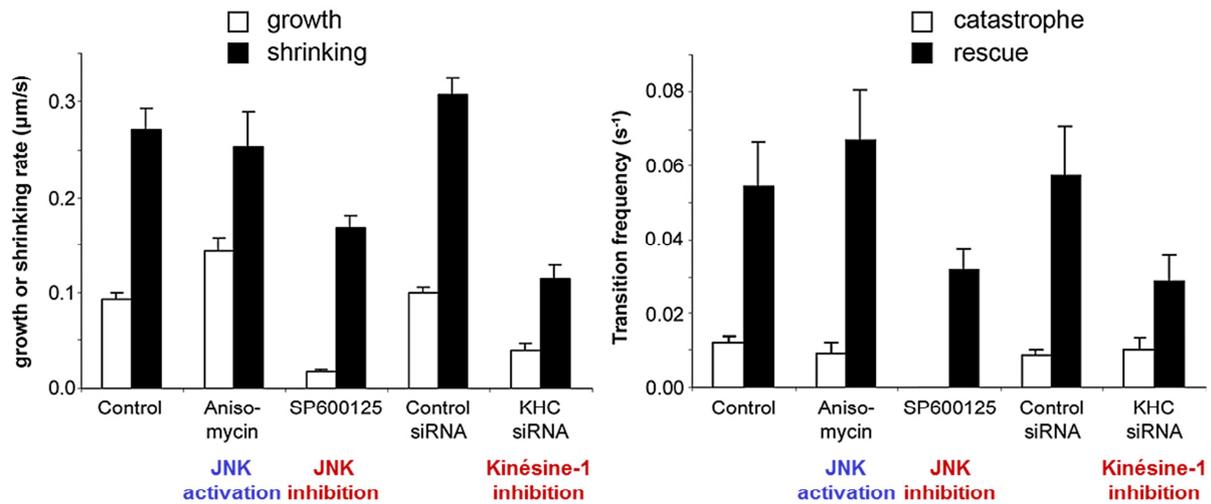


Figure 138 : La voie de signalisation Kinesine-1/JIP/JNK. La kinésine conventionnelle transporte les JNKs ainsi que ses kinases activatrices en amont de la cascade, avec l'aide de la protéine d'échafaudage JIP1/3 le long des MTs. Les MAP3Ks et les JNKs peuvent dissocier le complexe des MTs en phosphorylant la chaîne lourde de la kinésine-1 (KHC) et les JIPs (d'après **Daire and Pous, 2011**).

B – Impact de JNK sur la dynamique des microtubules

Précédemment, au laboratoire il a été démontré que dans des cellules épithéliales (RPE1), l'inhibition de la kinésine-1 (KHC siRNA) diminue les vitesses de polymérisation, dépolymérisation, ainsi que la fréquence de sauvetage des MTs (**Daire et al., 2009 ; cf. Figure 139**). De plus, cette étude a montré que l'activation de JNK augmente la vitesse de croissance et la fréquence de sauvetage des MTs, tandis que l'inhibition de JNK (SP600125) diminue les vitesses de polymérisation et dépolymérisation, ainsi que la fréquence sauvetage (**Daire et al., 2009 ; cf. Figure 139**).

Ainsi, les auteurs ont montré que la voie kinésine-1/JIP/JNK contrôle des étapes clés du cycle de vie des MTs (**Daire et al., 2009**).



Analyse des paramètres de la dynamique des microtubules en les suivant dans des cellules RPE1 vivantes

Figure 139 : Régulation de la dynamique des MTs par la voie kinésine-1/JIP1/JNK dans les cellules épithéliales vivantes. L'activation de JNK (Anisomycin) affecte la croissance et le sauvetage des MTs, tandis que l'inhibition de JNK (SP600125) ou de la kinésine-1 (KHC siRNA) affecte la polymérisation, la dépolymérisation et le sauvetage des MTs (d'après **Daire et al., 2009**).

Dans cette étude, les auteurs ont également montré que la densité du réseau microtubulaire est maintenue du fait de l'activité de la kinésine-1 (via son rôle activateur de JNK) et de celle du facteur de sauvetage, CLIP-170. En effet, la double inhibition de JNK et CLIP-170 résulte en un désassemblage marqué des MTs. Ces résultats suggèrent donc que la voie kinésine-1/JIP1/JNK et CLIP-170 coopèrent dans la construction du réseau microtubulaire de cellules en interphase (**Daire et al., 2009**).

Matériel et méthodes

Partie I : Culture cellulaire

I - Cellules employées

Différents types cellulaires ont été utilisés lors de cette étude. Toutes les cellules utilisées sont des cellules épithéliales cancéreuses ou immortalisées.

A - Cellules HeLa

La lignée cellulaire HeLa (ATCC® CCL-2™, ExPASy CVCL_0030) est constituée de cellules épithéliales dérivées d'une tumeur du col de l'utérus prélevée chez une patiente âgée de plus de 50 ans, (nommée Henrietta Lacks), à l'hôpital de Johns Hopkins (Etats-Unis) en 1951 (**Rogelio and Lasso, 2011**). Ce sont des cellules cancéreuses, adhérentes. Le génotype d'Henrietta Lacks a été établi grâce à des études sur les cellules HeLa du cancer du col de l'utérus. Puis, il a été déterminé avec les phénotypes de son mari et de ses enfants. (**Hsu et al., 1976**).

B - Cellules PtK2 (NBL-5)

Les cellules PtK2 (*Potorous tridactylus* Kidney 2) (ATCC® CCL 56™, ExPASy CVCL_0514) sont des cellules épithéliales de rein d'un rat kangourou mâle adulte (*Potorous tridactylus*). Cette lignée cellulaire est couramment utilisée pour étudier des processus biologiques. En effet, les cellules sont grandes, adhérentes et contiennent un nombre faible de grands chromosomes. Elles sont donc idéales pour étudier la dynamique cellulaire, comme les mitoses ou les microtubules en microscopie à fluorescence en temps réel. Le génome de cette lignée a été séquencé récemment (**Udy et al., 2015**). Expérimentalement, au laboratoire, des PtK2- α -Tubuline-GFP sont également cultivées. Leur grande taille permet une observation du réseau microtubulaire plus facilement que dans d'autres cellules plus petites. Ainsi, le suivi des MTs et l'analyse de leurs dynamiques est possible.

Les cellules PtK2 sont plus difficiles à transfecter et à cultiver, que les cellules HeLa, du fait qu'elles poussent lentement.

C - Cellules RPE-1

Les cellules RPE-1 (*Retinal Pigment Epithelium*) (ATCC® CRL-4000™, ExPASy CVCL_4388) proviennent de l'épithélium pigmentaire de la rétine humaine. Ce sont des cellules épithéliales immortalisées avec hTERT (*human TElomerase Reverse Transcriptase*). Ainsi, ces cellules humaines non cancéreuses constituent une lignée cellulaire. Elles sont adhérentes, faciles à cultiver et assez faciles à transfecter.

II - Conditions de culture

Les cellules sont cultivées sous une hotte à flux laminaire dans des flasques en plastique de 75 cm² (TPP®, 90076) ou de 25 cm² (TPP®, 90026) avec 10 mL ou 5 mL de milieu complet (cf. **Tableau 17**). Toutes les cellules sont cultivées dans ce milieu, sauf les PtK2, pour lesquelles un milieu complet sans antibiotiques est utilisé. En fonction des expériences, les cellules sontensemencées dans des plaques de 6 puits (TPP®, 92006) ou des boîtes de 10 cm² (Falcon®, 353003). Elles peuvent également croître sur des lamelles de verres (18x18 mm, VWR®, ECN 631-1567 ou 25x25 mm, MENZEL-GLÄSER) stérilisées et déposées au fond des puits des plaques 6 puits. Les cellules sont incubées à 37°C sous atmosphère saturée en humidité, en présence de 5 % de CO₂. Le niveau de confluence est vérifié au microscope à contraste de phase. Les cellules sont cultivées jusqu'à une confluence d'environ 60 %, 80 %. Puis, elles sont repiquées et réensemencées dans une nouvelle flasque.

Produit	Volume
Milieu DMEM (Dubelcco's Modified Eagle's Medium liquid) 1X : glucose 4,5 g/L + GlutaMAX™ 1 % (100 mg/L D-Glucose), bicarbonate de sodium, sans L-Glutamine (Gibco® by life technologies™, 31966-021)	450 mL
Sérum de Veau Fœtal (SVF) 10 % (Sigma® Life Science, F7524)	50 mL
Antibiotiques 1 % contenant Pénicilline et Streptomycine (Penstrep antibiotic Penicillin 10,000 U/mL, Streptomycin 10,000 µg/mL) (Gibco® by life technologies™, 15140-122)	5 mL

Tableau 17 : Composition du milieu complet utilisé en culture cellulaire.

A - Le repiquage des cellules

Afin de repiquer les cellules, nous utilisons de la Trypsine-EDTA pour les décoller de leur support. Le protocole est le suivant : la flasque est d'abord rincée avec du PBS (DPBS, 1X) (Gibco® by life technologies™, 14040-091), préalablement chauffé (37°C) afin de retirer toutes traces résiduelles de milieu. Puis les cellules sont décollées avec 3 mL de Trypsine-EDTA 0,25 % (Gibco® by life technologies™, 25200-072) pendant 2 min à 37°C. La suspension cellulaire est ensuite récupérée et diluée dans 5 mL de milieu complet (afin de stopper l'action de la trypsin). Puis, elle est centrifugée à 1000 g pendant 3 min. Le surnageant est éliminé et le culot cellulaire est repris dans du milieu complet. Par exemple, généralement les cellules PtK2 sont repiquées au 1/5^{ème} une fois par semaine et les cellules HeLa au 1/10^{ème} deux fois par semaine. Pour les expériences, une quantité définie de cellules estensemencée. Pour cela, il faut déterminer la concentration cellulaire par comptage des cellules à l'aide d'une cellule de comptage (KOVA®, 87144).

B - Congélation et décongélation

Afin de conserver les lignées cellulaires et de garantir une meilleure reproductibilité des résultats, les cellules sont congelées et décongelées. Elles sont congelées à un nombre de passages faible. Après décongélation, les cellules sont utilisées pendant environ dix passages.

Afin de congeler les cellules, il faut d'abord décoller les cellules (soit les récupérer en suspension cellulaire selon le protocole décrit précédemment). Puis, les cellules sont réparties dans des cryotubes, en mettant environ 2 millions de cellules par cryotube dans 1 mL de milieu de congélation. Ce dernier correspond au milieu complet dans lequel est ajouté 10 %

de SVF et 10 % de DMSO (Euromedex, UD8050). Les cryotubes sont ensuite placés à -80°C dans une boîte contenant de l'isopropanol pendant au moins 24h, ce qui permet de diminuer progressivement la température (-1°C/min) et enfin, ils sont placés dans les containers d'azote liquide (-195,79°C).

Pour décongeler les cellules, il faut récupérer un cryotube et le transférer le plus vite possible de l'azote liquide au bain marie à 37°C. Une fois le contenu du cryotube décongelé, il est transféré dans 4 mL de milieu complet (préalablement chauffé à 37°C) et centrifugé à 1000 g pendant 3 min. Le surnageant est ensuite éliminé et le culot cellulaire est repris dans 1 mL de milieu complet et le tout est mis dans 5 ou 10 mL de milieu complet, respectivement dans une flasque T25 ou T75. Le milieu est changé le lendemain et la flasque sera alors cultivée jusqu'à confluence des cellules.

III - Transfection transitoire des lignées cellulaires

La transfection transitoire permet de faire entrer un ou des acides nucléiques (ADN/ARN) étranger(s) (plasmide(s)) dans une cellule. L'ADN ainsi incorporé par endocytose permettra l'expression de la protéine codée de façon transitoire. Dans cette étude, différents plasmides codant diverses protéines ont été utilisés (cf. **Tableau 18**). Les différents agents de transfusions utilisés sont : Turbofect (Thermo Scientific, R0532), JetPEI® (Polyplus transfection™, 101-10N) ou Fugene (Roche, 06365787001). Ces agents sont des molécules cationiques ou des liposomes. Ils vont se complexer avec l'ADNp chargé négativement. Les complexes, ainsi formés, sont déposés sur les cellules en douceur afin de ne pas les dissocier et vont rentrer dans les cellules grâce au mécanisme d'endocytose. Une fois que les complexes sont entrés dans les cellules, ils vont se dissocier permettant de libérer l'ADNp. Ce dernier sera transcrit dans le noyau, assurant une expression transitoire de la protéine. Le Fugene est un agent de transfection utilisé pour des cellules difficiles à transfecter, comme les hépatocytes.

ADN plasmidiques	Provenance	Conditions d'utilisation
mcherry- α Tub		0,5 μ g transfection de 48h ou 72h
GFP-Tu β bIVb ^{WT} ; GFP-Tu β bIVb ^{T219A} ; GFP-Tu β bIVb ^{T219E} ; GFP-Tu β bIVb ^{S172A} ; GFP-Tu β bIVb ^{S172E} ; GFP-Tu β bIVb ^{S172D} ; GFP ^{T186A} -Tu β bIVb ^{WT} ; GFP ^{T186A} -Tu β bIVb ^{T219A} ; GFP ^{T186A} -Tu β bIVb ^{T219E}	Fourest-Lieuvain et al., 2006 (modifié par mutagenèse dirigée)	1 μ g ou 0,5 μ g transfection de 24h ou 48/72h
GFP ^{T186A} -H1 ^{WT} ; GFP ^{T186A} -H1 ^{T25A} ; GFP ^{T186A} -H1 ^{S147A} ; GFP ^{T186A} -H1 ^{T25A/S147A} ; GFP ^{T186A} -H1 ^{S312A} ; GFP ^{T186A} -H1 ^{T25A/S312A} ; GFP ^{T186A} -H1 ^{S147A/S312A} ; GFP ^{T186A} -H1 ^{T25A/S147A/S312A} ; GFP ^{T186A} -H1 ^{WT-V278Stop} ; GFP ^{T186A} -H1 ^{T25A/S147A-V278Stop} ; GFP ^{T186A} -H1 ^{T25E/S147E-V278Stop}	Pierre et al., 1992 (modifié par mutagenèse dirigée)	1 μ g transfection de 24h ou 48h
Flag-MKK7-JNK1 α 1 ^{apf} ; Flag-MKK7-JNK1 α 1 ^{WT} ; Flag-MKK7-JNK2 α 2 ^{WT} ; Flag-MKK7-JNK1 α 1 ^{ML} (M108G, L168A)	Lei et al., 2002, Addgene (modifié par mutagenèse dirigée)	1 μ g transfection de 24h
mcherry-CLIP170 ^{T25A} ; mcherry-CLIP170 ^{T25E} ; mcherry-CLIP170 ^{S147A} ; mcherry-CLIP170 ^{S147E} ; mcherry-CLIP170 ^{T25A/S147A} ; mcherry-CLIP170 ^{T25E/S147E}	De Forges et al., 2016 (modifié par mutagenèse dirigée)	0,3 μ g transfection de 48h
YFP ^{T186A} -CLIP170 ^{WT} ; YFP ^{T186A} -CLIP170 ^{T25A/S147A} ; YFP ^{T186A} -CLIP170 ^{S147E/S147E}	(modifié par mutagenèse dirigée)	1 μ g transfection de 24h

Tableau 18 : ADN plasmidiques utilisés lors des transfections cellulaires transitoires. Les quantités indiquées correspondent à ce qui est utilisé pour un puits de plaque 6 puits.

A - Transfection transitoire au Turbofect

La veille de procéder à une transfection transitoire, les cellules sontensemencées dans des plaques 6 puits ou des boîtes de 10 cm² de diamètre. Pour accomplir la transfection, il faut ajouter 0,3 μ g, 0,5 μ g, 1 μ g ou 7 μ g de chaque ADN dans 100 μ L pour un puits ou 700 μ L pour une boîte de 10cm² de DMEM stérile (cf. **Tableau 17**). Ensuite, 3 μ L pour un puits ou 21 μ L pour une boîte de 10cm² de Turbofect (Thermo Scientific, R0532) sont ajoutés dans le mélange DMEM-ADN. Lorsque deux ADNs sont transfectés la quantité totale d'ADN, ainsi que le volume de Turbofect sont doublés. La quantité d'ADNp et de Turbofect change en fonction des plasmides, mais aussi de la contenance cellulaire utilisés. Le volume de Turbofect est doublé en cas de double transfection. Ce mélange est incubé 25 minutes à température ambiante. Le mélange DMEM-ADN-Turbofect est ensuite repris dans de l'OptiMEM® (Gibco® by life technologiesTM, 31985-047), 1 mL ou 5 mL est mis par puits ou boîte de 10 cm² respectivement. Les cellules sont utilisées 24h ou 48h après la transfection. Dans le cas d'une lyse 48h après la transfection, le milieu est changé 24h après la transfection.

B – Transfection transitoire au JetPEI®

Les cellules d'intérêt sont égalementensemencées la veille de la transfection dans des plaques 6 puits. Pour transfecter les cellules, 3 μ L de JetPEI® (Polyplus transfectionTM, 101-10N) sont mélangés dans 50 μ L de NaCl [150 mM] (Polyplus transfectionTM, 702-50), puis le mélange ainsi réalisé est ajouté goutte à goutte à une solution de 50 μ L de NaCl [150 mM] contenant 1 μ g d'ADN. Lorsque deux ADNs sont transfectés le volume de JetPEI® est doublé, mais pas celui du NaCl. Ensuite, ce mélange est incubé 25 minutes à température ambiante afin que les

complexes se forment. Après incubation des complexes, 900 μ L de milieu (OptiMEM® ou complet ; cf. **Tableau 17**) sont ajoutés sur ceux-ci et dispersés dans un des puits de la plaque 6 puits. Enfin, les cellules sont incubées à 37°C pendant 24h à 48h, avant d'être utilisées.

C - Transfection transitoire au Fugene

De la même manière qu'avec les autres agents de transfection, les cellules d'intérêt sontensemencées la veille de la transfection dans des plaques 6 puits. Pour réaliser la transfection, 3 μ L de Fugene (X-treme GENE 9 DNA Transfection Reagent, Roche, 06365787001) sont ajoutés dans 100 μ L de DMEM (Gibco® *by life technologies*TM, 31966-021, cf. **Tableau 17**). Puis, ce mélange est incubé 5 minutes à température ambiante. Le volume de Fugene est doublé en cas de double transfection. Puis, 1 μ g de chaque ADN est ajouté dans le mélange DMEM-Fugene. Ce mélange est incubé 25 minutes à température ambiante. Le mélange DMEM-Fugene-ADN est mis dans 1 mL d'OptiMEM® (Gibco® *by life technologies*TM, 31985-047). Enfin, 1 mL est mis par puits, et les cellules sont incubées à 37°C. Les cellules sont utilisées 24h à 48h après la transfection.

IV - Traitement cellulaire

Lors de l'étude, un activateur chimique (anisomycine, Enzo® Life Sciences, BML-ST102), ou un inhibiteur chimique (SP600125, Enzo® Life Sciences, BML-EI305), ou d'autres activateurs : les UVC ou le NaCl, sont utilisés pour moduler l'activité de JNK. L'anisomycine est un antibiotique qui va activer la voie des MAPKs (cf. **Figure 140-A**). L'irradiation des cellules avec les UVC vont activer JNK en induisant des dommages à l'ADN (cf. **Figure 140-B**), tandis que le NaCl active JNK via un stress oxydant (cf. **Figure 140-C**). Le SP600125 est un inhibiteur des JNKs couramment utilisé dans la littérature (cf. **Figure 140-A**). C'est un inhibiteur compétitif qui se fixe à la place de l'ATP.

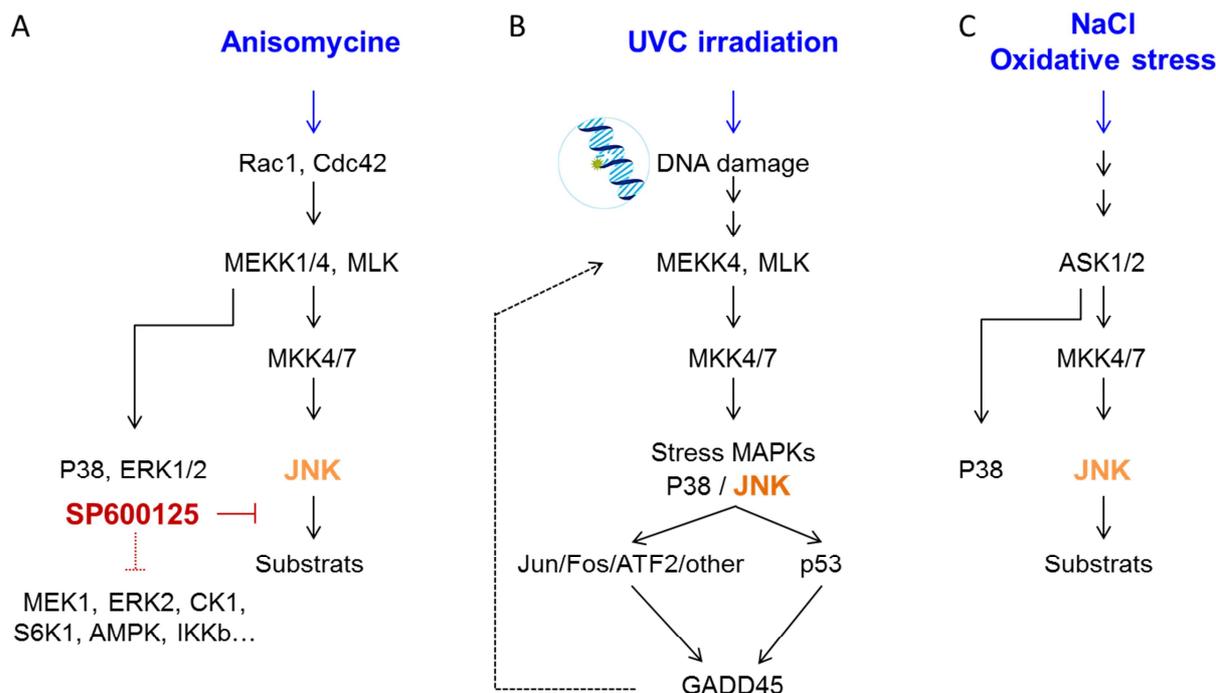


Figure 140 : Modulation de l'activité de JNK. (A) Activation par l'anisomycine (1,2 μM , 5 min à 1h) de la voie des MAPKs et inhibition par le SP600125 (20 μM , 1h à 3h) de JNK (d'après Daire *et al.*, 2009 ; Zeke *et al.*, 2016). (B) Activation de la voie des MAPKs de stress par l'irradiation des cellules aux UVC (200 J/m^2 , 10 min) (d'après Hildesheim *et al.*, 2002 ; Zeke *et al.*, 2016). (C) Activation de JNK via l'induction d'un stress oxydant par le NaCl (350 mM, 1h) (d'après Khorasanizadeh *et al.*, 2017)

Ces composés chimiques sont dilués dans le DMSO (Euromedex, UD8050) de manière à avoir une concentration finale de 4 mM pour l'anisomycine ou 20 mM pour le SP600125. Ils sont ensuite dilués dans le milieu de culture de façon à avoir une concentration finale de 1,2 μM pour l'anisomycine ou 20 μM pour le SP600125 et 0,1 % de DMSO. Ces composés ainsi dilués sont ensuite mis sur les cellules pendant 1h à 3h, à 37°C. Lors de l'étude pour chaque expérience, un contrôle négatif est réalisé. Celui-ci correspond à la condition pour laquelle seulement le DMSO, mais pas la drogue, est ajouté aux cellules, de manière à avoir 0,1 % de DMSO final. Dans la condition contrôle (DMSO, 0,1 %), les cellules sont aussi incubées pendant 1h à 3h, à 37°C.

Durant l'étude d'autres inhibiteurs des autres MAPKs ou d'autres kinases ont été utilisés, UO126 (inhibiteur d'ERK1/2 ; Sigma®, U120), SB203580 (inhibiteur de p38 α/β ; Sigma® Life Science, S8307), CILi (inhibiteur de GSK3 β ; Sigma®, 203637). Ces inhibiteurs sont également dilués dans du DMSO à des concentrations stocks de 10 mM, 20 mM, et 8 M respectivement. Ils sont utilisés à des concentrations finales de 10 μM , 10 μM , et 30 mM respectivement. Pour cela, ils sont dilués dans le milieu de culture.

Partie II : Microscopie à fluorescence

I- Immunofluorescence

L'immunofluorescence est une technique de visualisation via la fluorescence d'une ou de plusieurs protéine(s) dans la cellule. Pour mener à bien cette méthode, il faut d'abord fixer les cellules préalablement ensemencées dans des plaques 6 puits contenant des lamelles de verres 18x18 mm ou 25x25 mm. La fixation des cellules est réalisée en ajoutant du méthanol, méthanol-EGTA ou du paraformaldéhyde (Sigma®, P 6148). Le choix du fixateur est fait en fonction de quelle protéine d'intérêt est visualisée.

A - Fixation au méthanol

La fixation avec le méthanol permet de précipiter les protéines par déshydratation, ainsi que de perméabiliser les cellules en solubilisant les lipides des membranes. Cette fixation est notamment utilisée pour observer la tubuline. C'est une fixation appropriée pour la préservation du cytosquelette en général et du réseau microtubulaire en particulier.

Les cellules sont d'abord lavées avec du PEM chaud (37°C), puis elles sont fixées avec du méthanol froid pendant 5 minutes à -20°C. Plusieurs lavages avec du PBS (-MgCl₂, SO₄²⁻) sont ensuite réalisés afin d'éliminer le méthanol résiduel et réhydrater les cellules. Enfin l'immunomarquage peut être effectué. Une fois la fixation réalisée, les cellules peuvent être conservées dans du PBS (-MgCl₂, SO₄²⁻) à 4°C.

B - Fixation au paraformaldéhyde (PFA)

Ce type de fixation permet de conserver la localisation subcellulaire des protéines étudiées, du fait de la formation de liaisons entre ces dernières, mais elle ne perméabilise pas les cellules. En ajoutant du triton X-100, ce dernier perméabilise les membranes plasmiques et permet ensuite aux anticorps de pouvoir entrer dans la cellule. Avec cette fixation, il est possible d'observer des transgènes, tels que mcherry-CLIP-170.

Les cellules sont tout d'abord lavées avec du PBS 1X (-MgCl₂, -SO₄²⁻) ou du PEM chaud (37°C). Elles sont ensuite fixées avec du PFA 4% (cf. **Tableau 19**) pendant 15 minutes à température ambiante. Puis, elles sont de nouveau lavées avec du PBS (-MgCl₂, SO₄²⁻). Les cellules sont perméabilisées et les sites aspécifiques sont saturés avec une solution PBS/triton 0,1 %/BSA 1 % pendant 10 minutes à température ambiante. Avant de réaliser l'immunomarquage plusieurs lavages sont réalisés. A ce stade, les cellules peuvent comme précédemment être conservées dans le PBS (-MgCl₂, -SO₄²⁻) à 4°C.

C - Fixation méthanol-EGTA/PFA

Cette fixation est utilisée pour observer CLIP-170 endogène.

Les cellules sont d'abord lavées avec du PBS 1X (-MgCl₂, -SO₄²⁻) ou du PEM chaud (37°C). Sur ces dernières du MeOH-EGTA [1 mM] est ajouté et laissé 10 min à -20°C. Le

méthanol-EGTA est retiré et du PFA 4 % est ajouté pendant 15 min à température ambiante. Le PFA est ensuite retiré et les cellules sont rincées avec du PBS 1X (-MgCl₂, -SO₄²⁻). Puis les cellules sont perméabilisées avec du PBS/Triton 0,15 % 2 fois 5 min. Elles sont ensuite incubées avec du PBS/BSA 1 %/Tween 0,1 % pendant 10 min. Après cette étape l'immunomarquage peut être réalisé, ou les cellules peuvent être conservées dans le PBS 1X (-MgCl₂, -SO₄²⁻) (protocole adapté de **Coquelle et al., 2002**).

Solution	Composition	Concentration finale
Paraformaldéhyde 4 % (Sigma®, P 6148)	PAF	4 g dans 100 mL d'eau milliQ
	NaOH	quelques gouttes
Mowiol® 4-88 (CALBIOCHEM®, 475904)	Mowiol®	2,4 g
	Glycérol	6 g
	Tris pH 8	0,2 M (12 mL)
	DABCO	0,66 g (2,5 %)

Tableau 19 : Composition des solutions utilisées en immunofluorescence.

D - L'immunomarquage

Cette étape consiste à incuber les cellules avec des anticorps (cf. **Tableau 20**), afin que ces derniers se fixent sur leurs protéines d'intérêt.

Les anticorps primaires sont dilués dans du PBS/BSA 1 % et incubés à 37°C pendant 1h (ou 1 nuit à 4°C dans certains cas). Avant d'incuber les anticorps secondaires, les cellules sont rincées avec du PBS (-MgCl₂, SO₄²⁻) 3 fois 5 minutes. Les anticorps secondaires sont également dilués dans du PBS/BSA 1 % et incubés à 37°C, au noir, pendant 45 minutes. Les anticorps secondaires sont couplés à un fluorochrome et dirigés contre l'espèce de l'anticorps primaire. Enfin les cellules sont de nouveau rincées avec du PBS (-MgCl₂, SO₄²⁻) 3 fois 5 minutes.

Anticorps primaires	Espèce	Dilution	Conditions d'incubation	Références
Anti- α -tubuline (clone DM1A)	Souris	1/500 ^{ème}	1h à 37°C	Sigma-Aldrich®, T 6139
Anti-CLIP-115/170 # 16134	Lapin	1/200 ^{ème} (ou 1/500 ^{ème})	1h à 37°C, ou O/N à 4°C	Franck Perez
Anti-CLIP-115/170 # 16234	Lapin	1/500 ^{ème} (ou 1/200 ^{ème})	1h à 37°C, ou O/N à 4°C	Franck Perez
Paxilline	Souris	1/100 ^{ème}	30 à 60 min à 37°C, ou O/N à 4°C	Invitrogen™, AHO0492
Molécules fluorescentes	Type	Dilution	Conditions d'incubation	références
Hoeschst 33258 (200 μ g/mL)	Intercalent	1/500 ^{ème}	15 min à TA	Hoeschst 33342
Phalloïdine-TRITC ou FITC (actine)	Intercalent	1/500 ^{ème}	1h à 37°C	Sigma-Aldrich®, P 1951

Tableau 20 (début)

Anticorps secondaires (fluorescents)	Espèces	Dilution	Condition d'incubation	Références
Anti-humain (Alexa® 488)	Chèvre	1/5000 ^{ème}	1h à 37°C	Molecular Probes, A 11013
Anti-humain (Alexa® 555)	Chèvre	1/5000 ^{ème}	1h à 37°C	Molecular Probes, A 21433
Anti-souris (Alexa® 488)	Chèvre	1/5000 ^{ème}	1h à 37°C	Molecular Probes, A11001
Anti-souris (Alexa® 555)	Chèvre	1/5000 ^{ème}	1h à 37°C	Molecular Probes, A 21422
Anti-souris (Cyanine 5)	Chèvre	1/50 ^{ème}	1h à 37°C	Jackson immunoresearch, 800-367-529
Anti-souris (Fab FITC)	Chèvre	1/2000 ^{ème}	1h à 37°C	Sigma®, F 5262
Anti-lapin (Alexa® 488)	Singe	1/5000 ^{ème}	1h à 37°C	Molecular Probes, A 21206
Anti-lapin (Alexa® 555)	Chèvre	1/5000 ^{ème} ou 1/2000 ^{ème}	1h à 37°C	Molecular Probes, A 21428 ou Sigma®, T 5268
Anti-lapin (Cyanine 5)	Chèvre	1/2000 ^{ème}	1h à 37°C	Jackson immunoresearch, 111-175-144

Tableau 20 : Anticorps primaires et secondaires utilisés en immunofluorescence.

E - Montage des lames et observation au microscope à fluorescence

Après les derniers lavages au PBS ($-\text{MgCl}_2$, SO_4^{2-}), les lamelles sont montées sur des lames. Différents milieux de montage peuvent être utilisés : PBS-Glycérol 90 %, *Prolong® Gold antifade reagent with/without DAPI* (4',6-diaminido-2-phenylindole, Invitrogen™, P36935), ou Mowiol® (CALBIOCHEM®, 475904, cf. **Tableau 19**). Les lames sont laissées séchées à température ambiante dans le noir, puis du vernis est mis sur les bords de la lamelle afin de solidifier le contact de la lamelle avec la lame. Les lames peuvent être conservées à 4°C (dans le noir).

Les images sont enregistrées canal par canal et les différents canaux sont superposés à l'aide des logiciels de traitement d'images, Image-J ou Adobe Photoshop.

II - Imagerie en temps réel

L'imagerie en temps réel permet de filmer les cellules afin de pouvoir analyser des processus dynamiques tels que l'observation des comètes CLIP-170 ou l'instabilité dynamique des microtubules.

Pour réaliser des films, les cellules (majoritairement les PtK2) sontensemencées et transfectées comme indiqué précédemment, puis 24h à 48h après transfection, les lamelles sont montées sur des lames de la manière suivante : deux morceaux de chattertou sont placés sur une lame de manière à délimiter un canal. La lamelle sur laquelle sont fixées les cellules est placée sur la lame et maintenue en place par deux autres bouts de chattertou. Le canal formé est rempli de milieu de culture. Ainsi, les transgènes fusionnés à des chromophores exprimés dans les cellules sont directement observables au microscope à épifluorescence. Les films sont réalisés avec environ 80 images sans délais entre les images, donnant des films d'une durée moyenne de 5 minutes. Les films sont ensuite analysés grâce au logiciel Image-J.

Les paramètres de base de l'instabilité dynamique des microtubules (vitesse de polymérisation, dépolymérisation ($\mu\text{m/s}$), fréquences de catastrophe ou sauvetage (s^{-1})) sont déterminés expérimentalement, en suivant au moins 3 MTs par cellule, image par image. Le protocole pour quantifier et analyser les paramètres de la dynamique des MTs a été décrit par **Dhamodharan and Wadsworth (1995)**. Les fréquences temporelles de catastrophe, de sauvetage et de pause sont définies comme le nombre d'événements de catastrophe ou de sauvetage, survenant respectivement pendant le temps total de croissance, de dépolymérisation ou pendant la durée de vie d'un MT (**Ferreira et al., 2014**). Pour analyser les comètes CLIP-170, il faut réaliser des kymographes grâce à des plugins d'image-J. Ces kymographes permettent via les outils d'image-J, de mesurer différents paramètres (longueur et nombre des comètes, ainsi que la durée des rétentions de CLIP-170 laissées derrière les comètes CLIP-170). Ainsi, les paramètres de l'instabilité dynamique peuvent être visualisés en microscopie en temps réel, notamment en utilisant des kymographes (**Pereira and Maiato, 2010**) qui donnent une représentation du bout (+) des MTs au cours du temps (**Ferreira et al., 2014**). Sur l'ensemble des données un test de Mann-Whitney peut être réalisé afin de déterminer la significativité des résultats. Ce test statistique est réalisé grâce au logiciel GraphPad Prism®, version 5.

Partie III : Biologie moléculaire et biochimie

I - Mutagénèse dirigée

La mutagénèse dirigée permet de changer une ou plusieurs bases dans la séquence de l'ADNp codant une protéine, dans le but d'échanger un acide-aminé par un autre, afin d'étudier son importance dans les mécanismes étudiés.

Dans cette étude, différentes mutations ont été réalisées. Elles ont consisté majoritairement à modifier un acide aminé phosphorylable (Ser ou Thr) en un acide aminé non phosphorylable (Ala), ou encore en un acide aminé phospho-mimétique (Glu). D'autres mutations ont été faites dans le but d'insérer un codon stop dans le gène codant une protéine, ou de modifier la poche de fixation de l'ATP de JNK (**Allen et al., 2007**).

La mutagénèse dirigée a été réalisée grâce à un kit (*QuickChange Lightning Site-Directed*, Agilent Technologies, 210518), contenant une ADN polymérase (*QuickChange Lightning Enzyme*) ayant une vitesse de polymérisation rapide (30 secondes/kb), des bactéries très compétentes (*XL10-Gold ultracompetent cells*) et une enzyme de restriction *DpnI* digérant l'ADNp en 5 min. Ce kit fonctionne très bien avec des plasmides longs (de 4 à 14 kb) et une petite quantité d'ADNp (100 ng), ainsi qu'avec des amorces simplement dessalées.

Expérimentalement, pour réaliser la mutagenèse dirigée différents éléments du kit sont mélangés (*10X QuickChange Lightning Buffer, QuickSolution reagent, dNTP mix*) dans de l'eau milliQ. Dans ce mélange est ajouté l'ADNp (100 ng/μL), contenant le gène d'intérêt à muter, ainsi que les deux oligonucléotides complémentaires synthétiques (250 ng/μL), contenant la mutation (cf. **Tableau 21**). Puis, 0,5 μL d'enzyme, ADN polymérase est ajouté par condition (volume totale de 25 μL).

Une fois le mélange prêt, une PCR (*Polymerase chain Reaction*) est réalisée afin d'amplifier le nouveau ADNp contenant la mutation souhaitée. Les paramètres des cycles de la PCR (cf. **Figure 141**) sont définis par le kit. À la fin de la PCR, un ADN bicaténaire contenant la mutation est obtenu.

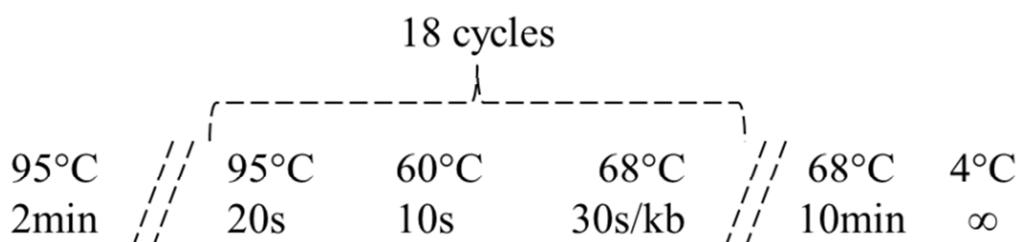


Figure 141 : Schéma des cycles de la PCR. Le cycle PCR commence par une étape à 95°C permettant l'ouverture de la double hélice d'ADN. Ensuite, l'étape à 60°C correspond à l'hybridation des amorces à l'ADN. Enfin, l'étape à 68°C correspond à la polymérisation du nouveau brin d'ADN à partir des amorces grâce à l'ADN polymérase (pour nos plasmides elle dure entre 7 et 10 minutes) (**d'après Agilent.com**).

T186A (GFP)	T186A (YFP, β-Tubuline)
Séquence Forward : 5'-TCA- <u>ACT</u> -AGC-AGA-CCA-TTA-TCA-ACA-AAA-TGC-TCC-AAT-TGG-CGA-TG-3' Séquence Reverse : 5'-CAT-CGC-CAA-TTG-GAG-CAT-TTT-GTT-GAT-AAT-GGT-CTG-CTA-GTT-GA-3' Nombre de bases : 44 Tm (°C) : 61,3 ; GC (%) : 40,9 Concentration (μM) : 100 Provenance - date : Eurogentec - 06/10/2015	Séquence Forward : 5'-CTA-CCA-GCA-GAA-CGC-CCC-CAT-CGG-CGA-3' Séquence Reverse : 5'-TCG-CCG-ATG-GGG-GCG-TTC-TGC-TGG-TAG-3' Nombre de bases : 27 Tm (°C) : 62,2 ; GC (%) : 66,7 Concentration (μM) : 100 Provenance - date : Eurogentec - 02/02/2016
T25A (CLIP-170)	T25E (CLIP-170)
Séquence Forward : 5'-AGC-ACA-GCT-CTG-AAG-GCA-CCT-ACG-GCT-GTT-G-3' Séquence Reverse : 5'-CAA-CAG-CCG-TAG-GTG-CCT-TCA-GAG-CTG-TGC-T-3' Nombre de bases : 31 Tm (°C) : 61,9 ; GC (%) : 58,1 Concentration (μM) : 100 Provenance - date : Eurogentec - 02/02/2016	Séquence Forward : 5'-GGA-AGC-ACA-GCT-CTG-AAG-GAA-CCT-ACG-GCT-GTT-GTA-GC-3' Séquence Reverse : 5'-GCT-ACA-ACA-GCC-GTA-GGT-TCC-TTC-AGA-GCT-GTG-CTT-CC-3' Nombre de bases : 38 Tm (°C) : 64,8 ; GC (%) : 55,3 Concentration (μM) : 100 Provenance - date : Eurogentec - 22/02/2016
T45A (CLIP-170)	T45E (CLIP-170)
Séquence Forward : 5'-AGT-GAA-AAA-GCA-TCA-AGC-GCT-CCA-TCA-TCT-GAG-ACT-C-3' Séquence Reverse : 5'-GAG-TCT-CAG-ATG-ATG-GAG-CGC-TTG-ATG-CTT-TTT-CAC-T-3' Nombre de bases : 37 Tm (°C) : 60,5 ; GC (%) : 45,9 Concentration (μM) : 100 Provenance : Eurogentec - 17/02/2016	Séquence Forward : 5'-TCC-AGT-GAA-AAA-GCA-TCA-AGC-GAG-CCA-TCA-TCT-GAG-ACT-CAG-GAG-3' Séquence Reverse : 5'-CTC-CTG-AGT-CTC-AGA-TGA-TGG-CTC-GCT-TGA-TGC-TTT-TTC-ACT-GGA-3' Nombre de bases : 45 Tm (°C) : 65,0 ; GC (%) : 48,9 Concentration (μM) : 100 Provenance : Eurogentec - 05/01/2017

Tableau 21 (début)

<p>A45E (CLIP-170)</p> <p>Séquence Forward : 5'-AGT-GAA-AAA-GCA-TCA-AGC-GAG-CCA-TCA-TCT-GAG-ACT-CAG-G-3'</p> <p>Séquence Reverse : 5'-CCT-GAG-TCT-CAG-ATG-ATG-GCT-CGC-TTG-ATG-CTT-TTT-CAC-T-3'</p> <p>Nombre de bases : 40</p> <p>Tm (°C) : 62,5 ; GC (%) : 47,5</p> <p>Concentration (µM) : 100</p> <p>Provenance - date : Eurogentec - 16/02/2017</p>	<p>T140A (CLIP-170)</p> <p>Séquence Forward : 5'-CTA-ATG-GCC-TGC-AGA-CAG-CGC-CCG-CCT-3'</p> <p>Séquence Reverse : 5'-AGG-CGG-GCG-CTG-TCT-GCA-GGC-CAT-TAG-3'</p> <p>Nombre de bases : 27</p> <p>Tm (°C) : 62,2 ; GC (%) : 66,7</p> <p>Concentration (µM) : 100</p> <p>Provenance - date : Eurogentec - 17/02/2016</p>
<p>S147A (CLIP-170)</p> <p>Séquence Forward : 5'-CTC-CCG-AGC-TAC-TGC-ACC-GCT-GTG-CAC-3'</p> <p>Séquence Reverse : 5'-GTG-CAC-AGC-GGT-GCA-GTA-GCT-CGG-GAG-3'</p> <p>Nombre de bases : 27</p> <p>Tm (°C) : 62,2 ; GC (%) : 66,7</p> <p>Concentration (µM) : 100</p> <p>Provenance - date : Eurogentec - 11/04/2013</p>	<p>A147E (CLIP-170)</p> <p>Séquence Forward : 5'-CTC-CCG-AGC-TAC-TGA-ACC-GCT-GTG-CAC-TTC-3'</p> <p>Séquence Reverse : 5'-GAA-GTG-CAC-AGC-GGT-TCA-GTA-GCT-CGG-GAG-3'</p> <p>Nombre de bases : 30</p> <p>Tm (°C) : 62,0 ; GC (%) : 60,0</p> <p>Concentration (µM) : 100</p> <p>Provenance - date : Eurogentec - 05/06/2013</p>
<p>S160A (CLIP-170)</p> <p>Séquence Forward : 5'-CAT-GGT-GTC-TTC-CGC-CCC-CTC-CAC-CC-3'</p> <p>Séquence Reverse : 5'-GGG-TGG-AGG-GGG-CGG-AAG-ACA-CCA-TG-3'</p> <p>Nombre de bases : 26</p> <p>Tm (°C) : 62,3 ; GC (%) : 69,2</p> <p>Concentration (µM) : 100</p> <p>Provenance - date : Eurogentec - 11/04/2013</p>	<p>T163A (CLIP-170)</p> <p>Séquence Forward : 5'-CTT-CCT-CCC-CCT-CCG-CCC-CTT-CAA-ACA-TC-3'</p> <p>Séquence Reverse : 5'-GAT-GTT-TGA-AGG-GGC-GGA-GGG-GGA-GGA-AG-3'</p> <p>Nombre de bases : 29</p> <p>Tm (°C) : 62,1 ; GC (%) : 62,1</p> <p>Concentration (µM) : 100</p> <p>Provenance - date : Eurogentec - 17/02/2016</p>
<p>T182A (CLIP-170)</p> <p>Séquence Forward : 5'-GCA-GCA-AAG-GAA-CCT-TCA-GCT-GCG-CCT-CCG-ATC-3'</p> <p>Séquence Reverse : 5'-GAT-CGG-AGG-CGC-AGC-TGA-AGG-TTC-CTT-TGC-TGC-3'</p> <p>Nombre de bases : 33</p> <p>Tm (°C) : 64,3 ; GC (%) : 60,6</p> <p>Concentration (µM) : 100</p> <p>Provenance - date : Eurogentec - 17/02/2016</p>	<p>S195A (CLIP-170)</p> <p>Séquence Forward : 5'-TTA-CAA-AAA-CTG-CCA-GTG-AAG-CTA-TCT-CCA-ACC-TTT-CAG-AG-3'</p> <p>Séquence Reverse : 5'-CTC-TGA-AAG-GTT-GGA-GAT-AGC-TTC-ACT-GGC-AGT-TTT-TGT-AA-3'</p> <p>Nombre de bases : 41</p> <p>Tm (°C) : 60,4 ; GC (%) : 41,5</p> <p>Concentration (µM) : 100</p> <p>Provenance - date : Eurogentec - 06/10/2015</p>
<p>T287A (CLIP-170)</p> <p>Séquence Forward : 5'-GCT-TCC-CTT-CCA-CTG-CAC-CAG-CCA-AAG-CC-3'</p> <p>Séquence Reverse : 5'-GGC-TTT-GGC-TGG-TGC-AGT-GGA-AGG-GAA-GC-3'</p> <p>Nombre de bases : 29</p> <p>Tm (°C) : 62,1 ; GC (%) : 62,1</p> <p>Concentration (µM) : 100</p> <p>Provenance - date : Eurogentec - 11/04/2013</p>	<p>S310A (CLIP-170)</p> <p>Séquence Forward : 5'-CCA-GCC-TGA-AGC-GCG-CCC-CTT-CTG-CCT-CTT-C-3'</p> <p>Séquence Reverse : 5'-GAA-GAG-GCA-GAA-GGG-GCG-CGC-TTC-AGG-CTG-G-3'</p> <p>Nombre de bases : 31</p> <p>Tm (°C) : 65,9 ; GC (%) : 67,7</p> <p>Concentration (µM) : 100</p> <p>Provenance - date : Eurogentec - 11/04/2013</p>
<p>S310-12A (CLIP-170)</p> <p>Séquence Forward : 5'-CAG-CCT-GAA-GCG-CGC-CCC-TGC-TGC-CTC-TTC-CCT-3'</p> <p>Séquence Reverse : 5'-AGG-GAA-GAG-GCA-GCA-GGG-GCG-CGC-TTC-AGG-CTG-3'</p> <p>Nombre de bases : 33</p> <p>Tm (°C) : 68,0 ; GC (%) : 69,7</p> <p>Concentration (µM) : 100</p> <p>Provenance - date : Eurogentec - 05/01/2017</p>	<p>S312A (CLIP-170)</p> <p>Séquence Forward : 5'-GAA-GCG-CAG-CCC-TGC-TGC-CTC-TTC-CCT-3'</p> <p>Séquence Reverse : 5'-AGG-GAA-GAG-GCA-GCA-GGG-CTG-CGC-TTC-3'</p> <p>Nombre de bases : 27</p> <p>Tm (°C) : 62,2 ; GC (%) : 66,7</p> <p>Concentration (µM) : 100</p> <p>Provenance - date : Eurogentec - 18/03/2014</p>

Tableau 21 (Suite)

S312E (CLIP-170)	M108G (Flag-MKK7-JNK1α1)
Séquence Forward : 5'-GCC-TGA-AGC-GCA-GCC- <u>CTG-AGG</u> -CCT-CTT-CCC-TCA-G-3'	Séquence Forward : 5'-GAA-TTT-CAA-GAT-GTT-TAC-ATA-GTC- <u>GGG</u> -GAG-CTC-ATG-GAT-GCA-AAT-CTT-TG-3'
Séquence Reverse : 5'-CTG-AGG-GAA-GAG-GCC- <u>TCA</u> -GGG-CTG-CGC-TTC-AGG-C-3'	Séquence Reverse : 5'-CAA-AGA-TTT-GCA-TCC-ATG-AGC-TCC- <u>CCG</u> -ACT-ATG-TAA-ACA-TCT-TGA-AAT-TC-3'
Nombre de bases : 34 Tm (°C) : 67,8 ; GC (%) : 67,6 Concentration (μ M) : 100 Provenance - date : Eurogentec - 24/01/2017	Nombre de bases : 50 Tm (°C) : 62,8 ; GC (%) : 40,0 Concentration (μ M) : 100 Provenance - date : Eurogentec - 06/10/2015
L168A (Flag-MKK7-JNK1α1)	V278Stop (CLIP-170)
Séquence Forward : 5'-TAG-TAA-AAT-CTG-ATT-GCA-CTT-TGA-AGA-TT <u>G-CTG</u> -ACT-TCG-GTC-TGG-C-3'	Séquence Forward : 5'-ATA-TGG-CTT-GTT-CGC-TCC-TGT-CCA-CAA- <u>ATA-AAC</u> -CAA-GAT-TGG-CTT-CC-3'
Séquence Reverse : 5'-GCC-AGA-CCG-AAG-TCA-GCA-ATC-TTC-AAA-GTG-CAA-TCA-GAT-TTT-ACT-A-3'	Séquence Reverse : 5'-GGA-AGC-CAA-TCT-TGG- <u>TTT-A</u> TT-TGT-GGA-CAG-GAG-CGA-ACA-AGC-CAT-AT-3'
Nombre de bases : 45 Tm (°C) : 62,2 ; GC (%) : 41,3 Concentration (μ M) : 100 Provenance - date : Eurogentec - 06/10/2015	Nombre de bases : 31 Tm (°C) : 63,9 ; GC (%) : 44,7 Concentration (μ M) : 100 Provenance - date : Eurogentec - 05/09/2016
T219A (β-Tubuline)	T219E (β-Tubuline)
Séquence Forward : 5'-ACC-CTA-AAG-CTG-ACC- <u>GCA</u> -CCC-ACT-TAC-GGT-G-3'	Séquence Forward : 5'-GAA-CCC-TAA-AGC-TGA- <u>CCG-AAC</u> -CCA-CTT-ACG-GTG-ACC-3'
Séquence Reverse : 5'-CAC-CGT-AAG-TGG-GTG- <u>CGG</u> -TCA-GCT-TTA-GGG-T-3'	Séquence Reverse : 5'-GGT-CAC-CGT-AAG-TGG- <u>GTT-CGG</u> -TCA-GCT-TTA-GGG-TTC-3'
Nombre de bases : 31 Tm (°C) : 61,9 ; GC (%) : 58,1 Concentration (μ M) : 100 Provenance - date : Eurogentec - 06/10/2015	Nombre de bases : 36 Tm (°C) : 63,9 ; GC (%) : 55,6 Concentration (μ M) : 100 Provenance - date : Eurogentec - 06/10/2015

Tableau 21 : Séquence des oligonucléotides utilisés en mutagenèse dirigée (Suite et fin). L'oligonucléotide V278Stop a été désigné d'après **Akhmanova et al.**, (2001).

Une fois ce nouveau ADNp obtenu, il faut incuber le mélange PCR avec *DpnI* pendant 5 min à 37°C (cf. **Figure 142**), afin de digérer l'ADNp de départ (« sauvage ») méthylé. La taille des produits obtenus (après PCR et digestion par *DpnI*) peut être analysée et vérifiée en gel agarose contenant du BET (Bromure d'éthidium).

Enfin, il faut procéder à une transformation, c'est-à-dire incorporer l'ADNp dans des bactéries ultra-compétentes (cf. **Figure 142**). Pour chaque condition 10 μ L de bactéries sont incubées avec 0,5 μ L de β Me pendant 2 min, puis avec le mélange PCR-*DpnI* pendant 30 min. Afin, de faire rentrer l'ADNp dans les bactéries un choc thermique est réalisé, soit 30s à 42°C suivi de 2min dans la glace. Avant d'étaler les bactéries transformées sur du milieu LB-agarose + antibiotique dans des boîtes de pétri, elles sont laissées pendant environ 1h à 37°C dans un milieu riche, le NZY⁺ (cf. **Tableau 22**). Les bactéries ayant incorporées le plasmide d'intérêt pourront pousser, grâce au gène de résistance contenu dans l'ADNp sous forme de colonies sur le milieu LB-agar (cf. **Tableau 22**) contenant un antibiotique (Ampiciline (Euromedex, EU400) à 50 ng/ μ L ou Kanamycine (Sigma®, K-4000) à 30 ng/ μ L).

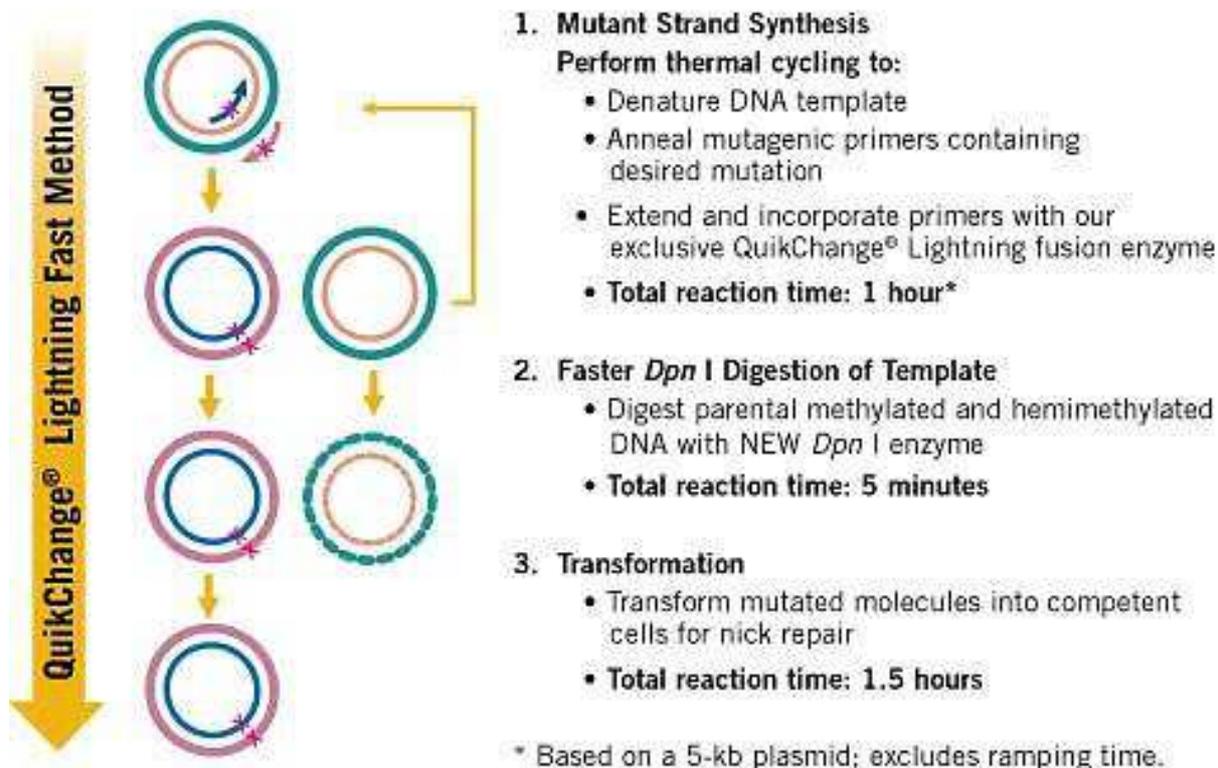


Figure 142 : Principe général de la méthode de mutagenèse dirigée (QuickChange[®] Lightning Site-directed, Agilent technologies), résumant les trois grandes étapes de la technique : PCR (permettant d'incorporer la mutation dans l'ADN plasmidique), digestion par *Dpn*I et transformation bactérienne (d'après Agilent.com).

Les bactéries sont cultivées dans du milieu LB liquide (cf. **Tableau 22**), contenant des antibiotiques pour maintenir la pression de sélection. L'ADNp est ensuite purifié par MiniPrep (BIO BASIC INC.) ou MaxiPrep (QIAGEN[®], 12163). Puis, l'ADNp est séquencé, afin de vérifier la présence de la mutation souhaitée et l'absence de mutations spontanées non désirées. Pour le séquençage, l'ADNp est dilué dans de l'eau milliQ (50-100 ng/μL) et mélangé avec 2 μL d'amorces (10 pmol/μL ou 10 μM), dans un volume total de 15 μL, selon les recommandations d'Euofins (Value Read – Trusted And Reliable DNA Sequencing).

Milieu riche NZY⁺	10 mL milieu LB 125 μL MgCl ₂ (1 M) 125 μL MgSO ₄ (1 M) 200 μL glucose 20 %
Milieu LB (<i>Luria Bertani</i>) à 5 g/L de NaCl ; pour 1 L	10 g Tryptone BSE-Free (Euromedex, G211) 5 g extraits de levure (Euromedex, UY2010) 5 g NaCl (Euromedex, 1112) Ajuster le pH à 7 avec le NaOH 30 % (10N) (VWR [™] ProLabo, 28 217-292)
Milieu LB–agar ; pour 1 L	1 L milieu LB 15 g d'agar (Euromedex, 1330)

Tableau 22 : Composition des milieux NZY⁺, LB et LB-agar utilisés en bactériologie.

II - Lyse cellulaire

A - Extraits protéiques totaux

Pour lyser les cellules et obtenir des extraits protéiques totaux, les cellules sont d'abord lavées avec du PBS 1X préchauffé à 37°C (cf. **Tableau 23**), afin de retirer toutes traces résiduelles de milieu. Les cellules sont grattées dans 100 µL pour des boîtes de 10cm² de TE2X préchauffé à 100°C (cf. **Tableau 23**). Le SDS (à 4%) contenu dans le TE2X solubilise afin d'obtenir le lysat cellulaire. le lysat est chauffé 5 min à 100°C, puis soniqué deux fois, 3 sec à 50 Watt (BIOBLOCK SCIENTIFIC vibra Cell™, 72442). Afin de déterminer la concentration en protéines totales, un aliquot de chaque échantillon est prélevé et dilué pour le dosage. Puis dans chaque tube 33,4 µL de TE4X préchauffé à 100°C (cf. **Tableau 23**) sont ajoutés. Ils sont ensuite mis à chauffer à 100°C pendant 5 min. Enfin, les échantillons ainsi préparés sont conservés à -20°C avant utilisation ou sont directement utilisés en WB.

PBS 1X	Solution commerciale (Gibco® by life technologies™, 14040-091)
PBS	137 mM NaCl ; 2,7 mM KCl (R.P. NORMAPUR®, 26 764.232) ; 10 mM Na ₂ HPO ₄ (Fisher Scientific, S/3720/60) ; 1,84 mM KH ₂ PO ₄ (Sigma®, P-0662)
TE2X	0,0625 M Tris/HCl pH 6,8 ; 4 % SDS ; 10 % Glycérol (Euromedex, 50405)
TE4X	0,0625 M Tris/HCl pH 6,8 ; 8 % SDS ; 40 % Glycérol ; 10 % βMe (Sigma-Aldrich® chemistry, M 6250) ; 0.02 % Bleu de bromophénol (Sigma®, B-6131)

Tableau 23 : Composition des solutions (PBS, TE2X et TE4X) utilisées lors de la lyse cellulaire.

B - Extraits microtubulaires

Pour extraire les microtubules totaux, les cellules sont ensemencées dans des boîtes de 10 cm² jusqu'à environ 80 % de confluence.

Dans ce protocole, le tampon PEM (PIPES-EGTA-MgCl₂ ; cf. **Tableau 24**) est un tampon permettant de stabiliser et de conserver l'intégrité des microtubules. Il est utilisé pour les lavages et entre dans la composition de la solution de perméabilisation (cf. **Tableau 24**). Dans les tampons, les inhibiteurs de protéases et de phosphatases sont ajoutés extemporanément. Plusieurs inhibiteurs de phosphatases sont utilisés afin de ne pas perdre la phosphorylation qui est ensuite étudiée.

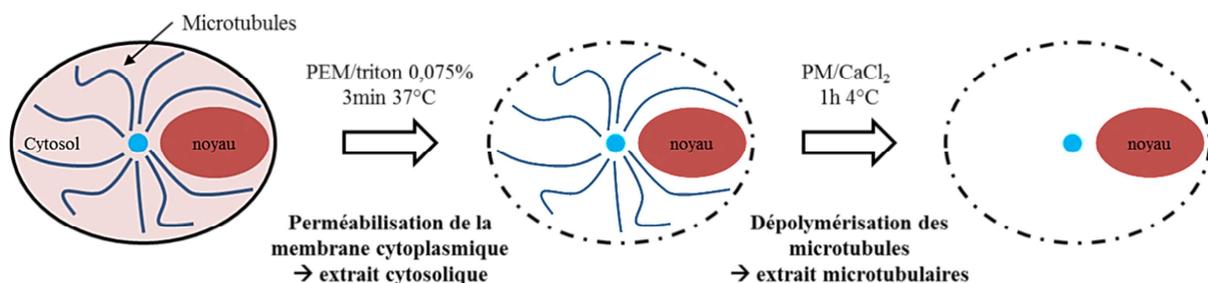


Figure 143 : Réalisation des extraits microtubulaires : extraction du cytosol et des microtubules totaux.

Afin de pouvoir récupérer la fraction cytosolique des cellules, elles sont d'abord lavées avec du tampon PEM (PIPES-EGTA-MgCl₂ ; cf. **Tableau 24**) préalablement chauffé à 37°C. Ensuite, la membrane plasmique est perméabilisée grâce au tampon PEM/triton X-100 0,075 % préalablement chauffé à 37°C (cf. **Tableau 24**), pendant maximum 3 min à 37°C. À la fin,

la fraction cytosolique est récupérée et conservée dans la glace (cf. **Figure 143**). Les cellules sont rincées 1 fois, doucement avec du PEM (chauffé à 37°C) afin d'éliminer l'excès de solution de perméabilisation. Enfin, les microtubules totaux sont extraits à 4°C pendant 1h en tampon PM/CaCl₂ (cf. **Tableau 24**). A la fin, la fraction microtubulaire est récupérée et conservée dans la glace. Les protéines associées aux microtubules, ainsi que les dimères de tubuline constituant les microtubules sont retrouvés dans la fraction microtubulaire (cf. **Figure 143**).

Les deux fractions (cytosolique et microtubulaire) ainsi récupérées sont ensuite clarifiées par centrifugation 10 min, à 4000 rpm, à 4°C, afin d'éliminer les débris cellulaires. Les deux fractions sont ensuite concentrées à 4000 rpm, à 4°C avec des unités de concentrations de 5 mL (Amicon® Ultra-4, UFC801096) ou 15 mL (Amicon® Ultra-15, UFC901096) jusqu'au volume souhaité.

Lorsque les échantillons sont analysés par SDS-PAGE contenant du PhosTag™, après avoir concentré les fractions cytosoliques et microtubulaires, le tampon est échangé avec du tampon Tris/HCl [10 mM] pH 7,5, pour éliminer les composants susceptibles de gêner la migration électrophorétique des protéines (cf. §VII de la partie III, **page 232**).

Tampon PEM pH 6,9	80 mM PIPES [25 mM] (Piperazine-N, N'-bis(2-ethanesulfonic acid), Euromedex, 1330) + 2 mM EGTA (<i>Ethylene Glycol Tetra-Acetic acid</i> , Sigma-Aldrich®, E4378) + 1 mM MgCl ₂ (Euromedex, 2189)
Tampon PM pH 6,9	80 mM PIPES [25 mM] + 1 mM MgCl ₂
Solution de perméabilisation : tampon PEM/Glycérol 10 %/triton X-100 0,075 % (pour 10 mL)	7,5 mL tampon PEM pH 6,9 + 1 mL Glycérol 100 % (Euromedex, 50405) + 75 µL Triton X-100 à 10 % (Sigma®, X-100) + Inhibiteurs de protéases ajoutés extemporanément : 50 µL PMSF [0,2 M] (Sigma®, P 7626) + 50 µL B/L [2 mg/mL/0,2 M] (Sigma®, B-6506/Sigma®, L 2884) + Inhibiteurs de phosphatases ajoutés extemporanément : 500 µL NaF [1 M] (Sigma®, S-1504) + 500 µL PyroP [0,2 M] (Sigma®, P 91-46) + 100 µL βGP [1 M] (Sigma®, G 5422) + 100 µL Na ₃ VO ₄ [0,1 M] (Sigma®, S-6508) + 100 µL pNPP [2 M] (Sigma®, N 4645)
Solution de dépolymérisation des microtubules : tampon PM/CaCl₂ [5 mM] (pour 10 mL)	9,05 mL tampon PM pH 6,9 + 50 µL CaCl ₂ [1 M] (Gen-Apex™ PROLABO, 33 604.631) + Inhibiteurs de protéases ajoutés extemporanément : 50 µL PMSF [0,2 M] + 50 µL B/L [2 mg/mL/0,2 M] + Inhibiteurs de phosphatases ajoutés extemporanément : 250 µL NaF [1 M] + 250 µL PyroP [0,2 M] + 100 µL βGP [1 M] + 100 µL Na ₃ VO ₄ [0,1 M] + 100 µL pNPP [2 M]
Tampon Tris/HCl [10 mM] pH 7,5 (pour 10 mL)	8,4 mL eau milliQ + 200 µL Tris/HCl [0,5 M] pH 7,5 + Inhibiteurs de protéases ajoutés extemporanément : 50 µL PMSF [0,2 M] + 50 µL B/L [2 mg/mL/0,2 M] + Inhibiteurs de phosphatases ajoutés extemporanément : 5000 µL NaF [1 M] + 500 µL PyroP [0,2 M] + 100 µL βGP [1 M] + 100 µL Na ₃ VO ₄ [0,1 M] + 100 µL pNPP [2 M]

Tableau 24 : Composition des tampons utilisés lors de l'extraction du cytosol et des microtubules totaux. (βGP : β-Glycerophosphate ; B/L : Benzamidine/Leupeptine ; NaF : Fluorure de Sodium ; Na₃VO₄ : Ortho-vanadate ; PMSF : fluorure de phénylméthylsulfonyle ; pNPP : paranitrophényl phosphate ; PyroP : Pyrophosphate).

Afin de vérifier si les extraits microtubulaires ont correctement été réalisés, les fractions MTs sont analysées et quantifiées en WB, via l'observation de l'α-tubuline et/ou de

STAT5A, une protéine cytosolique. Expérimentalement, un gel SDS-PAGE (10% d'acrylamide) est utilisé. L' α -tubuline doit être enrichie dans les fractions microtubulaires par rapport aux fractions cytosoliques, tandis que STAT5A doit uniquement être présente dans les fractions cytosoliques, indiquant que les fractions microtubulaires ne sont pas contaminées par le contenu cytosolique (Phung-Koskas *et al.*, 2005). Les échantillons sont ensuite analysés par Western-blot.

III - Immunoprécipitation (co-immunoprécipitation) par GFP-Trap®

Les méthodes biochimiques, d'immunoprécipitation (cf. Figure 144-A) ou de co-immunoprécipitation (cf. Figure 144-B) permettent de purifier une protéine d'intérêt ou de mettre en évidence une interaction protéique.

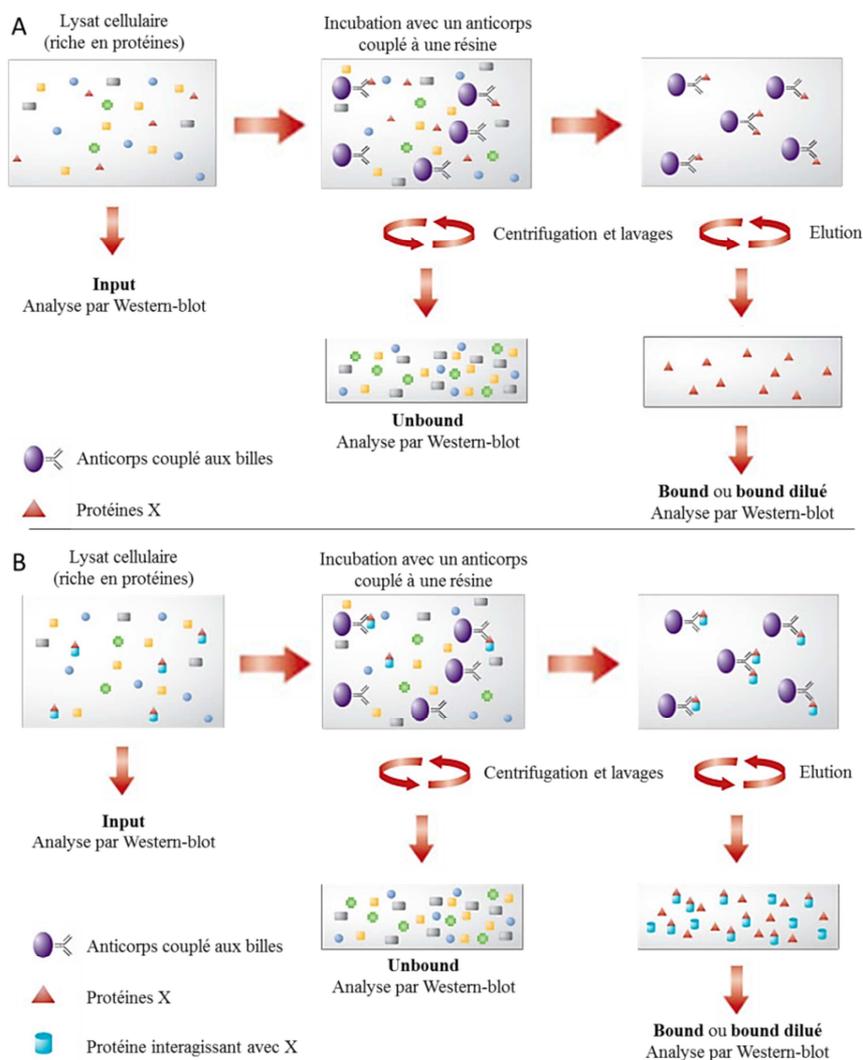


Figure 144 : Principe général de (A) l'immunoprécipitation et de (B) la co-immunoprécipitation. Un anticorps couplé à des billes est incubé avec un lysat cellulaire. L'incubation permet de fixer spécifiquement la protéine d'intérêt présente dans le lysat et la série de lavages permet d'éliminer les protéines fixées non spécifiquement aux billes. La dernière étape est l'éluion, elle permet de récupérer (A) la protéine d'intérêt ou (B) le complexe protéique, pouvant ensuite être analysé par Western-blot (d'après ThermoFisher.com).

L'immunoprécipitation (cf. **Figure 144-A**) est une méthode largement utilisée pour la détection et la purification d'une protéine. Pour réaliser cette technique, un anticorps (monoclonal ou polyclonal) est couplé à des billes et est dirigé contre un antigène cible. L'anticorps va se complexer spécifiquement à cette cible dans un échantillon complexe, comme un lysat cellulaire. Le complexe ainsi formé est précipité grâce au couplage de l'anticorps (Ac) avec les billes d'agarose ou magnétique. Par les lavages, les protéines qui ne sont pas accrochées aux Ac sur les billes sont éliminées. Finalement, l'antigène (et l'Ac) sont élués et analysés par Western-blot.

La co-immunoprécipitation (cf. **Figure 144-B**) consiste à immunoprécipiter une des protéines du complexe recherché à l'aide d'Ac couplés à des billes. Ces anticorps sont dirigés, soit contre la protéine, soit contre une étiquette portée par cette dernière. Après plusieurs lavages, afin d'éliminer les contaminants, les billes sont éluées et toutes les protéines du complexe sont contenues dans l'éluat et pourront être analysées.

Au cours de ce travail, les immunoprécipitations ou co-immunoprécipitations ont été réalisées grâce à des billes sur lesquelles des anticorps anti-GFP étaient greffés. Ce sont des billes commercialisées par Chromotek® sous le nom de GFP-Trap® (GFP-Trap®-A, Chromotek®). Lors de l'étude, nous avons immunoprécipité le domaine H1 (muté ou non) de CLIP-170 étiqueté GFP, ainsi que GFP- β -tubuline (muté ou non) et YFP-CLIP-170 (muté ou non). D'après la fiche technique du GFP-Trap®, 20 μ L de billes permet de récupérer environ 7 μ g de protéines étiquetées GFP ou YFP. Les billes d'agarose (Chromotek®) sont d'abord équilibrées en les lavant trois fois avec 500 μ L de tampon dilution/lavage 150 mM NaCl et centrifugées 3 min à 4000 rpm, à 4°C.

Pour chaque condition, 10^6 à 10^7 cellules HeLa exprimant une protéine d'intérêt étiquetée GFP ou YFP sont utilisées. Les cellules sont lavées avec du PBS chaud (37°C). Puis, les cellules sont grattées dans 200 μ L de tampon de lyse froid contenant comme détergeant du NP-40 (Nonidet P-40 ; Fluka, 74385 ; cf. **Tableau 25**). Les cellules sont incubées 30 min dans la glace, en l'agitant manuellement de temps en temps. Après, ce temps d'incubation, le tube est centrifugé à 14000 rpm, à 4°C, pendant 15 min. Enfin, le surnageant est récupéré et ajusté à un volume de 500 μ L avec le tampon de dilution/lavage 150 mM NaCl, ce dernier correspond à la fraction totale (lysate) des protéines contenues dans les cellules.

Une fois les billes équilibrées, le lysat cellulaire est incubé sur ces dernières. Avant de mettre le lysat au contact des billes, il faut prélever un aliquot du lysat cellulaire, correspondant à l'*input*, soit la fraction correspondante au lysat cellulaire total. Elle permet de vérifier le niveau d'expression de la protéine d'intérêt. Dans cet aliquot du TE4X chaud est ajouté. Après, l'ajout du TE4X, les échantillons sont chauffés à 100°C pendant 5 min, puis centrifugés quelques secondes à 14000 rpm et conservés à -20°C en attendant d'être déposés sur gel SDS-PAGE.

L'incubation des billes avec les extraits cellulaires est réalisée soit pendant 2 h ou une nuit à 4°C sous agitation. Pendant cette étape, les protéines d'intérêt étiquetées GFP ou YFP vont s'accrocher aux billes. Après incubation, les billes sont centrifugées 3 min à 4000 rpm, à 4°C. Le surnageant, correspondant à tout ce qui ne s'est pas lié aux billes (*unbound*) est éliminé. Un aliquot de l'*unbound* est conservé pour vérifier la diminution des protéines

d'intérêt étiquetées GFP ou YFP qui doivent être accrochées aux billes. L'*unbound* est repris dans le TE4X, chauffé à 100°C pendant 5 min, puis centrifugé rapidement et conservé à -20°C.

Les billes sont lavées trois fois par du tampon de dilution/lavage contenant 150 mM de NaCl, puis une quatrième fois par du tampon de dilution/lavage contenant 500 mM de NaCl (cf. **Tableau 25**). Cette dernière étape est nécessaire pour éliminer le maximum de protéines accrochées de manière non spécifique aux billes. Enfin, les billes sont séchées au maximum et reprises dans de l'eau milliQ, pour une analyse par Western-blot, ou dans du tampon JNK (cf. **Tableau 25**), pour une expérience de phosphorylation *in vitro*. Les volumes de tampons utilisés doivent être ajustés pour obtenir des concentrations en protéines comparables à celles des fractions *input* et *unbound*.

La fraction *bound* est reprise dans du TE4X, chauffée 5 min à 100°C et conservée à -20°C. Les différentes fractions (*input*, *unbound* et *bound*) sont ensuite analysées par Western-blot.

Tampon de lyse	10 mM Tris/HCl pH 7,5 ; 150 mM NaCl ; 0,5 mM EDTA (<i>Ethylene Diamine Tetra-Acetic acid</i> , Eurobio, 018744) ; 0,5 % Nonidet P-40 (Fluka, 74385) + inhibiteurs de protéases ajoutés extemporanément
Tampon de dilution/lavage 150 mM ou 500 mM NaCl	10 mM Tris/HCl pH 7,5 ; 150 mM ou 500 mM NaCl ; 0,5 mM EDTA + inhibiteurs ajoutés extemporanément
Inhibiteurs de protéases ajoutés extemporanément, pour 1 mL de tampon : 5 µL Benzamidine/Leupeptine [2mg/mL ; 0,2M] ; 5 µL PMSF [0,2M]	
Tampon JNK, pour 1 mL	50 mM Tris/HCl pH 7,5 + 150 mM NaCl ; 0,25 mM DTT (Sigma-Aldrich®, D O632) ; 0,1 mM EDTA ; 0,1 mM EGTA (Sigma-Aldrich®, E 4378) ; 5 mM ATP (Sigma®, A-9187) ; 25 mM MgCl ₂ + 1 mM Na ₃ VO ₄ ; 25 mM βGlycéro-phosphate ou PEM pH 6,9 (80 mM PIPES + 2mM EGTA + 1 mM MgCl ₂) + 150 mM NaCl ; 0,25 mM DTT ; 0,1 mM EDTA ; 5 mM ATP ; 24 mM MgCl ₂ + 1 mM Na ₃ VO ₄ ; 25 mM βGP + ajouté extemporanément : 50 µL ATP [0,1 M] ; 20 µL Na ₃ VO ₄ [0,1 M] ; 25 µL MgCl ₂ [1 M] ; 50 µL βGP [1 M] ; 10 µL B/L [2mg/mL ; 0,2M] ; 4 µL PMSF [0,2M]

Tableau 25 : Tampons utilisées en (co-)immunoprécipitation par GFP-Trap® et pour la phosphorylation *in vitro*.

IV – Phosphorylation *in vitro* à partir des protéines d'intérêts immunoprécipitées par GFP-Trap®

Dans ce travail, j'ai réalisé des essais de phosphorylation *in vitro* du domaine H1 de CLIP-170, ou de la β-tubuline par de la JNK recombinante active (GST-JNK1α1, Sigma-Aldrich®, J2455).

Après immunoprécipitation, les billes reprises dans le tampon JNK (cf. **Tableau 25**) sont séparées en différentes fractions de volumes égaux. Le tampon JNK, utilisé suivant les

recommandations du fournisseur est additionné de différents inhibiteurs de phosphatases (Na_3VO_4 , βGP) et de protéases (Benzamidine/Leupeptine, PMSF) (cf. **Tableau 25**).

A chaque fraction contenant la protéine à phosphoryler est ajouté la JNK recombinante active, pour une concentration finale de 20 ng/ μL . Un contrôle est réalisé en utilisant un volume identique de tampon JNK. Pour certaines conditions de phosphorylation du domaine H1 de CLIP, des dimères d' α/β -tubuline de cerveau de porc [10 $\mu\text{g}/\mu\text{L}$] (Cytoskeleton, T238P) sont ajoutés, à un ratio 1:1 ou de 2:1 par rapport à H1. La tubuline ajoutée est soit sous forme GTP, soit sous forme GDP. Pour la tubuline GTP, 0,1 mmol/L de GTP sont ajoutés aux dimères d' α/β -tubuline, alors que la tubuline GDP est obtenue après un cycle de polymérisation/dépolymérisation. Pour cela 200 μg de tubuline-GTP sont polymérisées pendant 20 min à 37°C. Les microtubules sont récupérés par centrifugation 15 min à 14000 rpm et à 37°C, puis dépolymérisés en PEM pendant 30 min à 4°C. Le mélange est centrifugé de nouveau à 14000rpm, à 4°C pendant 15 min pour éliminer les agrégats de tubuline. Un dosage protéique est réalisé afin de déterminer la concentration de tubuline-GDP ainsi obtenue. Dans d'autre cas, le test de phosphorylation est réalisé en présence de Nocodazole (Sigma, M404) à une concentration de 33 μM , ou en présence de 33 μM de Paclitaxel (Taxol®) (Sigma, T7402).

L'incubation avec JNK est réalisée dans un volume final d'environ 6 μL , pendant 1h à 30°C. Les échantillons sont ensuite repris dans du TE4X, chauffés 5 min à 100°C, puis déposés sur gels SDS-PAGE contenant du PhosTagTM ou congelés à -80°C.

Après les 1h d'incubation, les échantillons sont récupérés et les billes sont éluées en ajoutant du TE4X chaud. Les tubes sont chauffés pendant 5 min à 100°C puis ils sont conservés à -80°C, avant d'être déposés, ou ils sont directement déposés sur gels SDS-PAGE contenant du Phos-TagTM.

Le protocole ainsi que les différentes concentrations des constituants du tampon JNK ont été définies à partir des données de la littérature (**Raingaud et al., 1995 ; Zhang et al., 2001 ; Huang et al., 2003 ; Zhao et al., 2005 ; Shirakawa et al., 2011 ; Fiche technique de GST-JNK1 α 1 - Sigma-Aldrich®**).

V – Phosphorylation *in vitro* de la tubuline

La phosphorylation de la β -tubuline par JNK a été étudiée *in vitro* par deux méthodes différentes :

- Incorporation de [$\gamma^{32}\text{P}$] à partir de [$\gamma^{32}\text{P}$]-ATP
- Révélation de thréonines ou de sérines phosphorylées par Western-blot

Pour chaque méthode, la phosphorylation a été étudiée dans des conditions permettant ou non la polymérisation de la tubuline. Pour permettre la polymérisation de la tubuline, l'incubation a été effectuée en présence d'amorces de MTs stabilisées en taxol® et de GTP (cf. **Tableau 26**). Afin de préparer les amorces de MTs (ou MT₁₀), une solution de tubuline de cerveau de porc à 4 g/L est incubée 15 minutes à 37°C en présence de 1 mM de GTP et 10 % de DMSO. Ces conditions permettent la formation de courtes amorces de MTs. Après

l'incubation, ces amorces sont diluées au 1/10^{ème} dans du tampon PEM contenant 10 µM de taxol[®] pour les stabiliser.

Concernant l'incorporation de [γ ³²P], la solution de substrat (cf. **Tableau 26**) est incubée 30 minutes à 37°C en présence de 100 ng de JNK recombinante active (dans un volume de 10 µL) et de 5µL de la solution de [γ ³²P]-ATP (cf. **Tableau 26**). La réaction est arrêtée en déposant 20 µL du mélange sur des filtres de phosphocellulose P81. Ces filtres sont séchés à l'air libre, puis lavés 3 fois 10 minutes dans une solution d'acide phosphorique à 1 %. Cette étape de lavage permet d'éliminer le [γ ³²P]-ATP libre et de ne conserver sur les filtres que la tubuline phosphorylée par JNK. La radioactivité est ensuite mesurée sur un compteur à scintillation. Un blanc est réalisé en mesurant la radioactivité d'un mélange contenant 10 µL de substrat et 10 µL de JNK.

Tampon kinase	
MOPS, pH 6,9	25 mM
Glycéro-2-phosphate	25 mM
MgCl ₂	25 mM
EGTA	5 mM
EDTA	2 mM
DTT	0,25 mM
Remarque : avant utilisation, ce tampon est dilué au 1/5 ^{ème} en présence de 50 ng/µL de BSA	
Solution de [γ³²P]-ATP	
Tampon kinase	575 µL
ATP 10 mM	15 µL
[γ ³² P]-ATP (1 mCi/100 µL)	10 µL
Solution de substrat (dans un volume final de 10 µL)	
Tubuline de cerveau de porc (Cytoskeleton, T238P)	1 g/L
MT10	1/25 ^{ème}
GTP	1 mM

Tableau 26 : Solutions utilisées dans les expériences de radioactivité pour observer la phosphorylation *in vitro* de la β -tubuline par JNK.

Pour mesurer l'activité spécifique de JNK, il faut tout d'abord calculer la radioactivité spécifique (RS) du [γ ³²P]-ATP en utilisant la formule suivante :

$$RS = \frac{\text{cpm dans } 5 \mu\text{L de la solution de } [\gamma^{32}\text{P}]\text{-ATP}}{1,25 \text{ nmol ATP (} 5 \mu\text{L de la solution à } 250 \mu\text{mol/L)}} \quad (\text{cpm/nmol})$$

Puis l'activité spécifique de JNK (AS) peut être déterminée via la formule suivante :

$$AS = \frac{\Delta \text{ cpm} \times (25/20)}{RS \times E \times T} \quad (\text{nmol/min/mg})$$

Δ cpm = cpm échantillon-cpm blanc

25 : volume total de réaction

20 : Volume déposé sur les filtres

T : Durée de la réaction (minutes)

E quantité d'enzyme (mg)

VI - Dosage des protéines

Le dosage des protéines totales a été réalisé par la méthode à l'acide bicinchoninique (BCA), grâce au kit *PierceTM BCA Protein Assay Kit* (Thermo Scientific, 23225) en plaques 96 puits.

En milieu alcalin, les ions cuivriques Cu^{2+} présents dans le réactif sont réduits par certains acides aminés en ions cuivreux Cu^+ , qui forment un complexe avec le BCA. Ce complexe coloré en pourpre présente un maximum d'absorbance à 562 nm. La concentration protéique de nos échantillons est déterminée grâce à une courbe d'étalonnage réalisée avec de la BSA (*Bovine Serum Albumin*) allant de 0,05 à 2 mg/mL. L'absorbance à 562 nm est mesurée à l'aide d'un spectrophotomètre (ThermoLabsystems Multiskan EX). Puis, la concentration protéique des échantillons est calculée dans un fichier Excel®.

VII - Electrophorèse SDS-PAGE et Western Blot révélé par chimioluminescence

Le Western-Blot est une technique semi-quantitative permettant la séparation et la révélation des protéines d'intérêt à partir d'un mélange complexe. Cette méthode nécessite plusieurs étapes : électrophorèse SDS-PAGE, électrotransfert et immuno-révélation.

Le gel SDS-PAGE, dénaturant, permet de séparer les protéines en fonction de leurs masses moléculaires apparentes. Le gel contient du SDS qui permet de dénaturer et de charger négativement les protéines. Différents pourcentage en acrylamide/bisacrylamide (29/1) peuvent être utilisés selon la taille des protéines d'intérêt (cf. **Tableau 27**). Durant l'étude, des gels de 12 %, 10 %, 9 % et 6 % ont été réalisés (cf. **Tableau 27**).

Protéines d'intérêt	
Nom de la protéine	Masse moléculaire
CLIP-170, protéine recombinante étiquetée mcherry	201,9 kDa
CLIP-170, protéine recombinante étiquetée YFP	196,4 kDa
CLIP-170, protéine endogène	170 kDa
CLASP2	165 kDa
MKK7-JNK2 α 2, protéine recombinante active	130 kDa
MKK7-JNK1 α 1, protéine recombinante active	121 kDa
Tubuline β IVb, protéine recombinante étiquetée GFP	110 kDa
STAT5A	92 kDa
JNK1 α 1, protéine recombinante active étiquetée GST	80 kDa
Domaine H1 (en N-terminal de CLIP-170), protéine recombinante étiquetée GFP	80 kDa
Paxilline	68 kDa
Tubuline (β -tubuline ou α -tubuline), protéine endogène	55 kDa
JNK2 α 2, protéine endogène	54 kDa
JNK1 α 1, protéine endogène	46 kDa
c-Jun	48 kDa
ERK1 (p44)	44 kDa
ERK2 (p42)	42 kDa
P38 MAPK	43 kDa

Tableau 27 (début)

β -Actine	43 kDa
EB1	30-38 kDa
GFP	27 kDa
Gels SDS-PAGE	
Gel de séparation à 12 %	Pour 2 gels : 10 mL d'eau milliQ ; 6 mL d'acrylamide/bisacrylamide 29/1 40 % (Euromedex, EU0077) ; 4 mL de tampon Tris/HCl (1,8 M) pH 8,8 ; 100 μ L de SDS 20 % (Euromedex, EU0660) + 110 μ L d'APS 10 % (Sigma®, A 3678) et 25 μ L de TEMED (Euromedex, 50406)
Gel de séparation à 10 %	Pour 2 gels : 11 mL d'eau milliQ ; 5 mL d'acrylamide/bisacrylamide 29/1 40 % ; 4 mL de tampon Tris/HCl (1,8 M) pH8,8 ; 100 μ L de SDS 20 % + 110 μ L d'APS 10 % et 25 μ L de TEMED
Gel de séparation à 9 %	Pour 2 gels : 11,4 mL d'eau milliQ ; 4,5 mL d'acrylamide/bisacrylamide 29/1 40 % ; 4 mL de tampon Tris/HCl (1,8 M) pH 8,8 ; 100 μ L de SDS 20 % + 110 μ L d'APS 10 % et 25 μ L de TEMED
Gel de séparation à 6 %	Pour 2 gels : 12, 9mL d'eau milliQ ; 3 mL d'acrylamide/bisacrylamide 29/1 40 % ; 4 mL de tampon Tris/HCl (1,8 M) pH 8,8 ; 100 μ L de SDS 20 % + 110 μ L d'APS 10 % et 25 μ L de TEMED
+ MnCl ₂ ; Phos-Tag TM	+ 80 μ L MnCl ₂ [10 mM] (Sigma®, M-3624) ; 80 μ L PhosTag TM [5 mM] (NARD Institute, Ltd. MANAC Incorporated, AAL-170)
Gel de concentration 4,5 %	Pour 2 gels : 7 mL d'eau milliQ ; 1 mL d'acrylamide/bisacrylamide 29/1 40 % ; 2 mL de tampon Tris/HCl (0,625 M) pH 6,8 ; 15 μ L de SDS 20 % + 100 μ L d'APS 10 % et 20 μ L de TEMED

Tableau 27 : Masse moléculaire théorique des différentes protéines étudiées et/ou utilisées lors de l'étude, ainsi que la composition des gels SDS-PAGE d'acrylamide.

Avant de déposer les échantillons, ceux-ci sont chauffés à 100°C pendant 5 minutes, puis centrifugés. La migration est réalisée dans du tampon de migration (cf. **Tableau 28**) et elle est suivie grâce au marqueur de masse moléculaire (Page Ruler Prestained Protein Ladder, Thermo Scientific, 26617 ou Spectra Multicolor High Range Protein Ladder, Thermo Scientific, 26625, pour les protéines de plus grande taille, comme CLIP-170 endogène).

Lors de ce travail, certains gels ont été réalisés en présence de Phos-TagTM (NARD Institute, Ltd. MANAC Incorporated, AAL-170). Ce composé, développé par le département de Science fonctionnelle moléculaire à l'université d'Hiroshima (Wako, NARD Institute, Ltd.), permet de ralentir la migration des protéines phosphorylées (cf. **Figure 145**). En présence de Mn²⁺ (ou Zn²⁺), le Phos-TagTM forme un complexe, liant transitoirement les groupements phosphates présents sur les protéines et ralentissant ainsi leur migration (**Kinoshita et al., 2009 ; Kinoshita and Kinoshita-Kikuta, 2011 ; Kinoshita et al., 2012**). La résolution de cette technique permet de visualiser les différents niveaux de phosphorylations (mono-phosphorylation ou poly-phosphorylation) d'une même protéine (cf. **Figure 145**). Le Phos-TagTM a généralement été utilisé à la concentration de 20 μ M avec 40 μ M de MnCl₂.

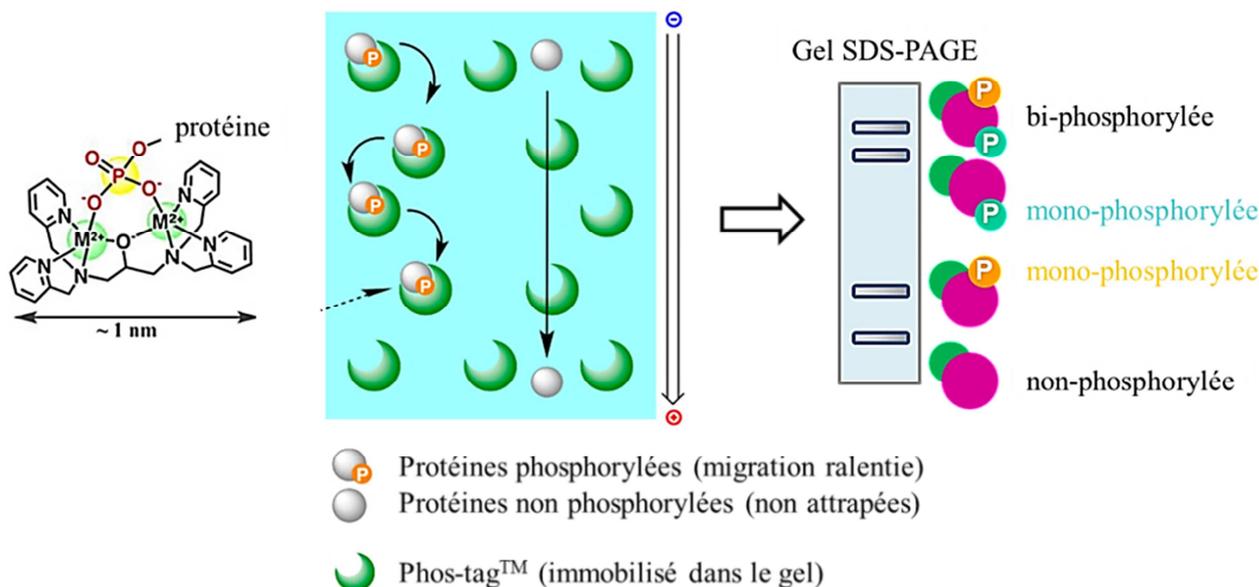


Figure 145 : Schéma montrant l'action du Phos-tag™ (Wako, NARD Institute, Ltd.) dans un gel SDS-PAGE au cours de la migration (d'après **Kinoshita et al., 2006** ; **Kinoshita et al., 2009**).

Afin d'améliorer la qualité des WB, plusieurs recommandations sont faites pour l'utilisation du Phos-Tag™ dans un gel SDS-PAGE. Pour éviter les distorsions dans le gel, il ne faut pas laisser de puits vides, il faut déposer le même volume dans tous les puits et il ne faut pas déposer un marqueur de masse moléculaire. De plus, un certain nombre de contaminants sont à éviter, comme l'EDTA (*Ethylene Diamine Tetra-Acetic acid*), l'EGTA (*Ethylene Glycol Tetra-Acetic acid*), les ions ($MnCl_2$, $CaCl_2$), les sels inorganiques (NaCl), le phosphate (PBS), les surfactants. Après la migration, le gel est rincé avec du tampon de transfert contenant de l'EDTA (1 mM) afin de neutraliser le Mn^{2+} présent dans le gel (**Kinoshita et al., 2009** ; **Kinoshita and Kinoshita-Kikuta, 2011** ; **Kinoshita et al., 2012**).

Après la migration, les protéines sont transférées sur une membrane de PVDF (GE Healthcare Life Sciences, Amersham™ Hybond™ P 0.45 PVDF, 10600023) ou de nitrocellulose (GE Healthcare Life Sciences, Amersham™ Protran™ 0,45µm NC, 10600002). Ce transfert est réalisé en milieu aqueux pendant 1h30 à 110 V ou une nuit à 40 V, à 4°C.

Tampons	
Tampon de migration (1X)	25 mM Tris base (Euromedex, 26-128-3094), 192 mM Glycine (Euromedex, 26-128-6405), 3,5 mM SDS
Tampon de transfert (1X)	25 mM Tris base, 192 mM Glycine, 20 % éthanol (Carlo Erba, 481115F)
TBS-Tween (TBST) 0,1 %	20 mM Tris/HCl pH 7,5 (Eurobio, 018772), 150 mM NaCl (Euromedex, 1112), 0,1 % Tween 20 (Euromedex, 2001)
Solution de saturation (lait 10 % ou BSA 5 %)	20 mM Tris/HCl pH 7,5, 150 mM NaCl, 0,1 % Tween 20 + 10 % Lait écrémé (Régilait®) ou 5 % BSA (Sigma® Life Science, DASIT GROUP, A2153)

Tableau 28 : Composition des tampons utilisés en Western-blot.

Une fois les protéines transférées, les membranes sont saturées dans une solution de lait 10 % en TBST 0,1 % ou de BSA 5 % en TBST 0,1 % (cf. **Tableau 28**) pendant environ 30 minutes à température ambiante.

Les membranes sont incubées avec les anticorps primaires, soit sur la nuit à 4°C, soit 1 à 3h à température ambiante (cf. **Tableau 29**). Les membranes sont ensuite lavées 3 fois

rapidement et 2 fois 15 minutes avec du TBST 0,1 % (cf. **Tableau 29**) à température ambiante. Puis, les membranes sont incubées avec les anticorps secondaires pendant environ 45 minutes à température ambiante (cf. **Tableau 29**). Les membranes sont lavées comme précédemment. Enfin elles sont incubées dans l'ECL (Pierce® ECL Western Blotting Substrate, Thermo Scientific, 32209), l'ECL + (Pierce® ECL Plus Western Blotting Substrate, Thermo Scientific, 32132), ou l'ECL Femto (SuperSignal®, West Femto Trial Kit, Thermo Scientific, 34094).

Après révélation, les films obtenus sont quantifiés grâce au logiciel Image-J et les quantifications sont analysées dans Excel®.

Anticorps primaires			
Noms	Espèces	Dilutions	Référence
Anti-CLIP-170 (H300) (C-term de CLIP-170)	Lapin (polyclonal)	1/100 ^{ème} à 1/1000 ^{ème} lait 5 % TBST 0,1 %	Santa Cruz Biotechnology, INC., Sc-25613
Anti-CLIP115/170 # 16234 (N-term de CLIP-170)	Lapin (polyclonal)	1/1000 ^{ème} lait 5 % TBST 0,1 %	Franck Perez
Anti-CLIP-170 # 16134 (C-term de CLIP-170)	Lapin (polyclonal)	1/1000 ^{ème} lait 5 % TBST 0,1 %	Franck Perez
Anti-CLASP2 (D5K3E)	Lapin (monoclonal)	1/1000 ^{ème} lait 5 % TBST 0,1 %	Cell Signaling Technology®, 14629
Anti-Phospho-Thréonines	Lapin (polyclonal)	1/1000 ^{ème} BSA 5 % TBST 0,1 %	Cell Signaling Technology®, 9381
Anti-Phospho-Sérines	Lapin (polyclonal)	1/1000 ^{ème} BSA 5 % TBST 0,1 %	Millipore, AB1603
Anti- α -tubuline clone DM1A	Souris (monoclonal)	1/5000 ^{ème} ou 1/10000 ^{ème} lait 5 % TBST 0,1 %	Sigma®, T6199
Anti- β -tubuline isotype I (Clone SAP 4G5)	Souris (monoclonal)	1/20000 ^{ème} lait 5 % TBST 0,1 %	Sigma®, T7816
Anti- β -tubuline isotype III (Clone SDL. 3D10)	Souris (monoclonal)	1/1000 ^{ème} lait 5 % TBST 0,1 %	Sigma®, T8660
Anti- β -tubuline isotype IV (Clone ONS. 1A6)	Souris (monoclonal)	1/400 ^{ème} lait 5 % TBST 0,1 %	Sigma®, T7941
Anti- β -tubuline isotype V	Lapin (polyclonal)	1/1000 ^{ème} lait 5 % TBST 0,1 %	Abcam, ab82368
Anti-Phospho-SAPK/JNK (Thr183/Tyr185) (81E11)	Lapin (monoclonal)	1/1000 ^{ème} BSA 5 % TBST 0,1 %	Cell Signaling Technology®, 4668
Anti-SAPK/JNK (56G8)	Lapin (monoclonal)	1/1000 ^{ème} lait 5 % TBST 0,1 %	Cell Signaling Technology®, 9258
Anti-Phospho-p44/42 MAPK (Erk1/2) (Thr202/Tyr204)	Lapin (polyclonal)	1/1000 ^{ème} BSA 5 % TBST 0,1 %	Cell Signaling Technology®, 9101
Anti-Paxilline	Souris (monoclonal)	1/1000 ^{ème} lait 5 % TBST 0,1 %	Invitrogen™, AHO0492
Anti-EB1 (H-70)	Lapin (polyclonal)	1/200 ^{ème} lait 5 % TBST 0,1 %	Santa Cruz Biotechnology, INC., Sc-15347
Anti-Phospho-c-Jun (Ser63)	Lapin (polyclonal)	1/1000 ^{ème} lait 5 % TBST 0,1 %	Cell Signaling Technology®, 9261
Anti-p38 MAP Kinase	Lapin (polyclonal)	1/1000 ^{ème} lait 5 % TBST 0,1 %	Cell Signaling Technology®, 9212
Anti-Phospho-p38 MAPK (Thr180/Tyr182) (28B10)	Souris (monoclonal)	1/2000 ^{ème} BSA 5 % TBST 0,1 %	Cell Signaling Technology®, 9216
Anti-DYKDDDDK Tag (9A3) (Binds to same epitope as Sigma's Anti-FLAG® M2 Antibody)	Souris (monoclonal)	1/1000 ^{ème} lait 5 % TBST 0,1 %	Cell Signaling Technology®, 8146
Anti- β -Actine (C4) HRP	Souris (monoclonal)	1/10000 ^{ème} lait 5 % TBST 0,1 %	Santa Cruz Biotechnology, INC., Sc-47778
Anti-GFP	Lapin (polyclonal)	1/1000 ^{ème} lait 5 % TBST 0,1 %	Cell Signaling Technology®, 2555
Anti-STAT5A	Lapin (polyclonal)	1/1000 ^{ème} lait 5 % TBST 0,1 %	Santa Cruz Biotechnologies, L-20 Sc-1081
Anti-p150 ^{Glued}	Souris (monoclonal)	1/1000 ^{ème} lait 5 % TBST 0,1 %	BD Biosciences, 610473 (BD transduction-Labo™)
Anticorps secondaires			
Noms	Espèces	Dilutions	Référence
Anti-Lapin HRP (SAR)	Mouton	1/5000 ^{ème} lait 5 % TBST 0,1 %	Cell signaling Technology®, 7074
Anti-Souris HRP (HAM)	Cheval	1/5000 ^{ème} lait 5 % TBST 0,1 %	Cell signaling Technology®, 7076

Tableau 29 : Anticorps primaires et secondaires avec les dilutions auxquelles ils sont utilisés en Western-blot.

Résultats et discussions

Dans les cellules épithéliales humaines en interphase, l'implication des kinases de stress de la famille de JNK dans la dynamique des MTs n'est pas encore bien connue. Au cours de ce travail de thèse, nous avons cherché à identifier de nouveaux substrats potentiels des JNKs dans l'environnement microtubulaire, afin d'approfondir les connaissances sur le fonctionnement de cette voie dans le contrôle de la dynamique des MTs.

En lien avec les précédents résultats du laboratoire (**Daire *et al.*, 2009**), les deux substrats qui ont été envisagés sont la β -tubuline, un constituant des MTs et CLIP-170, un facteur majeur de sauvetage des MTs (**Komarova *et al.*, 2002a**). Ces précédentes données montraient que lorsque JNK est activée, la kinase influence la dynamique des MTs en augmentant la vitesse de polymérisation et la fréquence de sauvetage des MTs. Sous l'influence de JNK, le changement de la vitesse de polymérisation pourrait être expliqué par la β -tubuline, tandis que les effets sur la fréquence de sauvetage pourraient être expliqués par CLIP-170.

Ce travail de thèse a donc consisté en une approche candidat, comportant deux parties.

La première partie correspond à l'étude des phosphorylations médiées par JNK sur CLIP-170, dont nous avons vu dans l'introduction qu'elle est le prototype de la famille des CLIPs et un régulateur majeur de la dynamique microtubulaire. Dans les cellules épithéliales en culture, nous avons identifié trois sites consensus de phosphorylation ciblés directement par JNK dans le domaine H1 en N-terminal de CLIP-170, ainsi que leur impact positif sur l'activité de sauvetage des MTs en interphase. Par ailleurs, nous avons montré que JNK ne change pas la localisation de CLIP-170 aux MTs et que la phosphorylation de ce dernier n'affecte pas le réseau microtubulaire de façon drastique. Ces résultats feront l'objet d'une publication, actuellement en préparation.

La deuxième partie correspond à l'étude des phosphorylations médiées par JNK sur la β -tubuline. Dans ce travail, nous avons montré que la β -tubuline est phosphorylée *in vitro*, mais sur un site non consensus de JNK. Nous n'avons pas réussi à mettre en évidence cette phosphorylation dans les cellules et à identifier le/les site(s) de phosphorylation qui semblent néanmoins être une ou des thréonine(s). L'ensemble des données obtenues n'ont pas permis d'identifier un effet significatif de la phosphorylation de la β -tubuline sur la dynamique des MTs. Ce travail présenté dans ce manuscrit de thèse, ne fera pas l'objet d'une publication.

Première partie : CLIP-170, un nouveau substrat de JNK dans les cellules épithéliales.

Dans cette partie, nous avons caractérisé CLIP-170 comme un nouveau substrat de JNK, en identifiant trois sites de phosphorylations spécifiques, ainsi que leurs effets sur l'activité de sauvetage des MTs, dans les cellules épithéliales en interphase. Ces données sont mises en forme dans l'article (cf. [page 247](#)).

Les protéines CLIP-170 sont des régulateurs importants de la dynamique microtubulaire dans divers organismes, en favorisant plus particulièrement le sauvetage des MTs (**Komarova et al., 2002a**). Au laboratoire, il a été montré que la kinésine-1 est impliquée dans le contrôle de la dynamique des MTs via la kinase de stress JNK, en augmentant la vitesse de polymérisation et la fréquence de sauvetage des MTs (**Daire et al., 2009**). Par ailleurs, depuis plusieurs années, CLIP-170 est définie comme une phosphoprotéine (**Rickard and Kreis, 1990 ; Rickard and Kreis, 1991 ; Hsu et al., 2011**), et un grand nombre de protéines kinases ont été identifiées pour phosphoryler CLIP-170, l'activant (**Choi et al., 2002 ; Yang et al., 2009 ; Li et al., 2010 ; Swietch et al., 2011 ; Amin et al., 2014 ; Kedashiro et al., 2015**) ou l'inhibant (**Nakano et al., 2010 ; Lee et al., 2010 ; Collazos et al., 2011 ; Kakeno et al., 2014**). Notamment la Ser312 qui est phosphorylée par l'AMPK (**Nakano et al., 2010**), la PKA (**Lee et al., 2010**), la PRK/PKN1/3 (**Collazos et al., 2011**), ou encore la Plk1 (**Kakeno et al., 2014**) a été impliquée dans un repliement intramoléculaire inhibiteur de CLIP-170.

Par conséquent, nous nous sommes intéressés aux effets de la phosphorylation de CLIP-170 par JNK sur la dynamique microtubulaire et la localisation subcellulaire de CLIP-170 dans les cellules épithéliales en interphase. Nos résultats montrent clairement un effet stimulateur de la voie de signalisation de JNK sur la fréquence de sauvetage des MTs en phosphorylant CLIP-170 sur trois sites indépendants, sans modifier la localisation subcellulaire de CLIP-170. Nous en déduisons donc que JNK et CLIP-170 coopèrent pour réguler le sauvetage des MTs, en réponse à des stress cellulaires.

I - CLIP-170 est une phosphoprotéine cible de JNK en condition de stress

Dans un premier temps et en lien avec les précédents résultats du laboratoire (**Daire et al., 2009**), nous avons cherché à caractériser la voie JNK/CLIP-170, en identifiant les sites de phosphorylation que JNK cible dans CLIP-170. Le temps d'activation de la voie de signalisation des JNKs, notamment avec le TNF peut influencer les réponses biologiques engendrées

(Ventura *et al.*, 2006). Par conséquent, nous utilisons deux sortes de stress pour activer la voie des MAPKs et donc des JNKs, soit des stress courts avec l'anisomycine (un antibiotique), ou les UVC, ou encore le NaCl, soit des stress longs avec les constructions constitutivement actives de deux isoformes de JNK (Flag-MKK7-JNK1 α 1 et Flag-MKK7-JNK2 α 2). Pour inhiber JNK, nous utilisons le SP600125 qui est un inhibiteur compétitif de la liaison de l'ATP. Nous avons également une construction inactive de JNK (Flag-MKK7-JNK1 α 1^{apf}) qui peut être un dominant négatif sur certains substrats.

A – Phosphorylation de CLIP-170 basale et médiée par un stress court activant JNK dans les cellules HeLa

L'analyse de la séquence peptidique de CLIP-170 a permis de mettre en évidence neuf sites consensus de phosphorylation pour JNK, c'est-à-dire des sites SP ou TP. Tous ces sites sont localisés dans le domaine H1, la partie N-terminale de la protéine contenant les deux domaines CAP-Gly, et parmi ceux-ci quatre sont conservés chez la souris, le rat, le poulet et le rat-kangourou (cf. **Figure 1A de l'article**). Nous avons ainsi travaillé avec le domaine H1 de CLIP-170 fusionné à une étiquette GFP mutée sur sa Thr186 en alanine (un acide aminé non phosphorylable) car nous avons trouvé que ce résidu est un site phosphorylé par JNK (donnée non montrée).

Pour valider, la phosphorylation par JNK de nos transgènes H1, nous avons étudié les effets de la kinase sur CLIP-170 endogène (cf. **Figures 1B de l'article et 146 des résultats complémentaires**). Nous n'avons pas réussi à observer d'effet fort de l'activation de JNK, mais l'inhibition de la kinase et non des autres MAPKs accélère la migration de CLIP-170 endogène, traduisant la déphosphorylation de la protéine. Ainsi, des sites de phosphorylations dans CLIP-170 déjà phosphorylés dans des conditions basales sont sensibles à l'inhibiteur spécifique de JNK, révélant que leur phosphorylation est dépendante de l'activité de JNK.

Dans des conditions de stress, nous avons révélé que la construction GFP-H1 de CLIP-170 est phosphorylée. En effet, après révélation d'un gel SDS-PAGE contenant du PhosTagTM, nous avons détecté différentes bandes, correspondantes aux trois formes non-phosphorylée, mono-phosphorylée ou poly-phosphorylée, suggérant la présence de plusieurs sites de phosphorylation. Grâce à la mutagenèse dirigée, nous avons pu observer que les mutations individuelles en alanine (Ala) de la Thr25, la Ser147 et/ou la Ser312 engendrent la disparition de leur(s) bande(s) respective(s) de phosphorylation (données non montrées), suggérant que ces résidus sont les trois sites majeurs de phosphorylation par JNK dans les cellules HeLa. En effet, lorsque ces trois sites sont mutés en Ala, nous observons seulement une bande sur le gel SDS-PAGE contenant du PhosTagTM, correspondante à la forme non phosphorylée de CLIP-170 (cf. **Figure 1C de l'article**). Il est important de noter que la Thr25 et la Ser147 sont des sites consensus de phosphorylation pour JNK, soit des motifs TP et SP, tandis que la Ser312 n'est pas un site consensus de phosphorylation pour JNK. Par ailleurs, la Thr25 n'est pas conservée chez le poulet et le rat-kangourou, alors que la Ser147 est un résidu conservé dans ces espèces (cf. **Figure 1A de l'article**).

Une fois que les acides aminés phosphorylés par JNK dans les cellules HeLa dans des conditions de stress ont été identifiés, nous avons cherché à mieux caractériser l'impact de la kinase sur chacun de ces résidus en mutant les autres sites en alanine (cf. **Figure 1C de l'article**). Concernant la Thr25, ce site n'est quasiment pas phosphorylé de manière basale, c'est-à-dire sans moduler l'activité de JNK. En revanche, la phosphorylation de la Thr25 est induite à partir de 5 minutes et jusqu'à 1h après activation de JNK par l'anisomycine (1,2 μ M). Cette phosphorylation est également induite après l'activation de JNK avec les UVC (200 J/m² pendant 10 min, puis récupération de 50 min), ainsi qu'avec le NaCl (350 mM pendant 1h). Dans tous les cas cette phosphorylation est spécifiquement inhibée avec l'inhibiteur de JNK et non avec les autres inhibiteurs de MAPKs (ERK1/2 et p38 α/β). À propos de la Ser147, en condition basale, elle est déjà phosphorylée et cette phosphorylation basale est augmentée seulement après 30 minutes d'activation de JNK par l'anisomycine. Cet acide aminé est aussi phosphorylé par JNK activée par les UVC, ou le NaCl dans les mêmes conditions que précédemment et est déphosphorylé seulement avec l'inhibiteur de spécifique de JNK. Quant à la Ser312, dans les conditions basales, ce résidu est aussi phosphorylé, mais cette phosphorylation n'est pas modifiée dans des conditions d'activation de JNK par l'anisomycine, les UVC et le NaCl, ou lors de l'inhibition de JNK et des autres MAPKs. Ainsi, la phosphorylation de ce site est indépendante de l'activité de JNK. La phosphorylation basale de la Ser312 peut être induite par d'autres kinases présentes dans les cellules (Nakano *et al.*, 2010 ; Lee *et al.*, 2010 ; Collazos *et al.*, 2011 ; Kakeno *et al.*, 2014). On notera que les trois stress qui nous ont permis d'induire la phosphorylation de CLIP-170 par JNK corrélaient tous avec un fort taux d'activation des isoformes de JNK endogène, mis en évidence par le taux de phosphorylation de son site T₁₈₃PY₁₈₅ par les kinases amont MKK4 et MKK7 (cf. **Figure 150 des résultats complémentaires**).

Ces expériences nous ont donc permis d'identifier que lors d'un stress court, deux résidus (Thr25 et Ser147) dans le domaine H1 de CLIP-170 sont phosphorylés par JNK. Ce sont des sites consensus de phosphorylation et la Ser147 est conservée chez la souris, le rat, le poulet et le rat-kangourou. Ces acides aminés présentent un niveau basal de phosphorylation et une cinétique de phosphorylation différents. On note également que ces phosphorylations ne sont pas interdépendantes.

B – Phosphorylation d'un troisième site consensus de phosphorylation lorsque JNK subit une activation longue dans les cellules HeLa

Nous avons souhaité savoir si un stress JNK de 24h engendre des changements dans la phosphorylation de CLIP-170. Pour induire une activation longue de JNK, les cellules HeLa ont été co-transfectées pendant 24h avec la construction GFP^{T186A}-H1 comme précédemment et les constructions constitutivement actives et inactive de JNK. Dans les constructions constitutivement actives, deux isoformes de JNK (JNK1 α 1 et JNK2 α 2) sont fusionnées avec leur kinase activatrice MKK7, assurant une constante phosphorylation du motif T₁₈₃PY₁₈₅ d'activation (cf. **Figure 118**). En revanche, pour la construction constitutivement inactive, le site d'activation

TPY est muté en une forme non phosphorylable, APF, dans la même protéine de fusion, Flag-MKK7-JNK1 α 1. L'utilisation des deux isoformes de JNK, l'une courte (JNK1 α 1) et l'autre longue (JNK2 α 2) nous a permis de savoir si celles-ci ont des effets différents.

Comme précédemment, nous observons que les constructions constitutivement actives (Flag-MKK7-JNK1 α 1 et Flag-MKK7-JNK2 α 2) provoquent la phosphorylation de la Thr25 et la Ser147, mais aussi d'un troisième acide aminé, caractérisé comme la Thr45 (cf. **Figure 1D de l'article**). Il est important de noter que ce résidu est un site consensus de phosphorylation pour JNK, soit un site TP et il est conservé chez le rat-kangourou. Comme précédemment lors d'un stress court, la Ser312 n'est pas phosphorylée par JNK lors d'un stress long. Quand ces quatre acides aminés (Thr25, Thr45, Ser147 et Ser312) sont mutés en alanine, il reste une bande mineure correspondant à H1 phosphorylée par JNK sur un autre site de phosphorylation (X), non caractérisé.

Nous avons donc révélé qu'un stress de 24h, médié par l'expression des constructions Flag-MKK7-JNK1 α 1 ou Flag-MKK7-JNK2 α 2, dans les cellules HeLa provoque la phosphorylation de CLIP-170 sur la Thr25, la Ser147, mais aussi la Thr45 et un site X non caractérisé. De plus, nous avons montré que ces quatre sites dans le domaine H1 de CLIP-170 sont phosphorylés de la même manière par les deux isoformes de JNK testés. Une analyse menée en spectrométrie de masse a aussi permis d'identifier des sites de phosphorylations additionnels qui pourraient correspondre à X (cf. **Figure 149 et Tableau 30 des résultats complémentaires**).

Avec ces expériences, nous ne savons pas si les phosphorylations sont directes ou si JNK active des sites d'amorçage pour le recrutement d'une autre kinase. Pour déterminer cela, nous avons réalisé des tests de phosphorylation *in vitro*.

C – Phosphorylation *in vitro* de CLIP-170 par JNK

Après avoir démontré que dans des conditions de stress activant JNK, le domaine H1 de CLIP-170 est phosphorylé sur trois acides aminés (Thr25, Thr45 et Ser147) dans les cellules épithéliales, nous avons voulu savoir si la phosphorylation de CLIP-170 par JNK était directe. Pour cela, nous avons réalisé des expériences de phosphorylation dans un système reconstitué *in vitro* avec une kinase recombinante active (GST-JNK1 α 1) plus ou moins active, le domaine H1 de CLIP-170 purifié de cellules HeLa par GFP-Trap® et pour certaines conditions des dimères d' α/β -tubulines.

Comme précédemment, nous avons déterminé, l'impact de l'activité de JNK pour chaque site en mutant les autres en alanine. La Thr25 n'est pas phosphorylée avec une kinase peu active, mais elle peut être phosphorylée en présence de dimères de tubuline (ratio 2 :1) (cf. **Figures 2A de l'article et Figure 147 des résultats complémentaires**). En revanche, avec une kinase très active, ce site est quasiment entièrement phosphorylé avec ou sans l'addition de dimères de tubuline. La phosphorylation basale de la Ser147 est augmentée seulement avec la JNK très active. Dans ce cas, l'efficacité de l'addition de dimères de tubuline est plus irrégulière (cf.

Figures 2A, 2B de l'article et 147 des résultats complémentaires). La Thr45 est phosphorylée uniquement avec une kinase très active et l'ajout de dimères de tubuline ne facilite pas systématiquement sa phosphorylation (cf. Figures 2B de l'article et 147 des résultats complémentaires). En effet, la quadruple mutation de ce site Thr45 en alanine avec les Thr25, Ser147 et Ser312 a permis de l'identifier comme substrat direct de JNK. Concernant la Ser312, comme vu précédemment dans les cellules, elle n'est probablement pas phosphorylée par JNK *in vitro* car le profil de phosphorylation de ce site est similaire et celui où tous les acides aminés sont mutés en alanine. Effectivement, lorsque tous les sites (Thr25, Thr45, Ser147 et Ser312) sont mutés en Ala, il reste la même bande de phosphorylation en présence de dimères de tubuline, correspondante à un autre site (X), non caractérisé (cf. Figure 2B de l'article).

Par ailleurs, l'utilisation d'un ratio 1 :1 de dimères de tubuline pour H1, ou l'emploi de tubuline-GDP, ne semblent pas affecter outre mesure le profil de phosphorylation de la Thr25 et la Ser147 par la JNK recombinante peu et très active respectivement (cf. Figure S3 de l'article). De même, la forme de la tubuline (monomère, dimère ou polymère) utilisée ne semble pas changer la phosphorylation de la Thr25 et la Ser147 par la kinase recombinante (cf. Figure 148 des résultats complémentaires).

L'ensemble de ces données *in vitro* suggère que les trois sites de phosphorylation (Thr25, Thr45 et Ser147) caractérisés dans les cellules épithéliales sont aussi phosphorylés dans un système *in vitro* par une kinase recombinante (GST-JNK1 α 1). Ce sont donc des phosphorylations directes dépendantes de JNK. De plus, grâce à l'utilisation de deux efficacités enzymatiques différentes de GST-JNK1 α 1, nous avons montré que la Thr25 semble être l'acide aminé le plus facilement ciblé par JNK. En effet, c'est le seul résidu légèrement phosphorylé avec une kinase peu active, alors que la Thr45 et la Ser147 sont uniquement phosphorylées lors de l'utilisation de la kinase très active. L'ajout des dimères d' α/β -tubulines dans le système *in vitro*, aide JNK à phosphoryler la Thr25 et plus irrégulièrement la Ser147, ainsi qu'un autre acide aminé (X), non caractérisé.

II – L'activité de sauvetage de CLIP-170 est stimulée par JNK

Dans la littérature, différentes études ont montré que des phosphorylations de CLIP-170 inhibent sa liaison aux MTs, ainsi qu'à ses partenaires protéiques, inhibant donc son activité (Nakano *et al.*, 2010 ; Lee *et al.*, 2010 ; Collazos *et al.*, 2011 ; Kakeno *et al.*, 2014 ; Nirschl *et al.*, 2016), le plus souvent en permettant un repliement intramoléculaire inhibiteur. Cependant, d'autres études ont montré que d'autres phosphorylations de CLIP-170 régulent positivement sa liaison aux MTs et à ses partenaires protéiques (Choi *et al.*, 2002 ; Yang *et al.*, 2009 ; Li *et al.*, 2010 ; Amin *et al.*, 2014 ; Kedashiro *et al.*, 2015). Par conséquent, dans un deuxième temps, nous avons cherché à définir l'impact des nouvelles phosphorylations que nous avons identifiées sur l'activité de CLIP-170, dans le contrôle de la dynamique des MTs. Pour cela, nous avons

suivi la fluorescence de la GFP-tubuline dans des cellules PtK2 (cellules épithéliales rénales de rat-kangourou) et HeLa (cellules épithéliales humaines du col utérin), sur-exprimant soit CLIP-170 entière (mCherry-CLIP-170), soit le domaine H1 de CLIP-170 (GFP^{T186A}-H1), non muté, rendu non phosphorylable (sites de phosphorylations mutés en alanine), ou phospho-mimétique (sites de phosphorylations mutés en acide glutamique).

A – Conservation de la phosphorylation du domaine H1 dans les cellules PtK2

Avant d'analyser le comportement dynamique des MTs en fonction de la phosphorylation du domaine H1, de CLIP-170, nous avons vérifié si les phosphorylations identifiées dans les cellules HeLa étaient retrouvées dans les cellules PtK2. Comme pour les cellules HeLa, dans les cellules PtK2 en interphase, l'activation de JNK via un stress court (anisomycine, 1,2 μ M 1h), permet la phosphorylation de la Thr25 et de la Ser147 qui sont bloquées par l'inhibiteur spécifique de JNK (SP600125, 20 μ M 3h) (cf. **Figure S4 de l'article**). Ces données nous permettent de dire que la phosphorylation de CLIP-170 humaine sur ses Thr25 et Ser147 peut aussi être effectuée par la kinase JNK des cellules PtK2, même si la CLIP-170 endogène dans cette espèce ne présente pas de Thr25 conservée. On notera que l'absence de ce site chez le rat-kangourou corrèle avec une migration inchangée de la CLIP-170 endogène quelque soit le niveau d'activation de JNK (cf. **Figure S1 de l'article**), suggérant que les différences de migration difficiles à observer dans les cellules HeLa correspondent probablement à une double phosphorylation plutôt qu'à une mono phosphorylation.

B – Impact de la phosphorylation de CLIP-170 sur la dynamique des microtubules

Dans les cellules épithéliales, l'influence de la voie JNK/CLIP-170 sur la dynamique microtubulaire a été étudiée en analysant quatre paramètres majeurs de la dynamique des MTs : soit les vitesses de polymérisation et dépolymérisation, ainsi que les fréquences de sauvetage et de catastrophe. Lors de l'utilisation des constructions phospho-mimétiques, mimant la phosphorylation de CLIP-170 sur la Thr25 et la Ser147, les fréquences de sauvetage sont augmentées (d'environ 2 fois) par rapport au contrôle, tandis que les autres paramètres ne semblent pas significativement modifiés (cf. **Figure 3A de l'article**). De plus, nous n'avons pas observé de différences majeures entre les cellules HeLa ou PtK2, ainsi qu'entre les effets des GFP^{T186A}-H1 et mCherry-CLIP-170 entière. Lors de l'utilisation des phospho-mimétiques simples, nous remarquons que similairement aux doubles phospho-mimétiques, les fréquences de sauvetage sont augmentées. Les autres paramètres de la dynamique des MTs ne sont pas significativement affectés, excepté pour la Thr45 (cf. **Figure S5 de l'article**). Pour celle-ci, la construction phospho-mimétique augmente de façon très importante la fréquence de sauvetage, mais aussi la vitesse de dépolymérisation, tandis que l'utilisation de la construction non-phosphorylable augmente la fréquence de catastrophe.

C – Impact de la phosphorylation de CLIP-170 par JNK sur les fréquences de sauvetage

Une analyse plus fine des fréquences de sauvetage a montré que lorsque les simples mutants phospho-mimétiques de CLIP-170 entière (Thr25E, Thr45E ou Ser147E) sont utilisés, les fréquences de sauvetage sont significativement augmentées par rapport mutants non-phosphorylables (Thr25A, Thr45A ou Ser147A), pour lesquels les fréquences de sauvetage sont légèrement diminuées (cf. **Figure 3B de l'article**). De la même manière que les simples mutations, dans les cellules PtK2 et HeLa, la phosphorylation de la Thr25 et de la Ser147 (EE) augmente les fréquences de sauvetage, tandis que les doubles mutants AA sur Thr25 et Ser147 diminue les fréquences de sauvetage, aussi bien avec CLIP-170 entière que le domaine H1 de CLIP-170, par rapport aux témoins. L'écart maximal entre les fréquences de sauvetage est donc observé entre les mutants EE et AA.

À partir des mêmes données, les fréquences de sauvetage ont été séparées en trois classes, en fonction de l'événement arrivant après la dépolymérisation : 1) re-polymérisation, 2) pause puis re-polymérisation et 3) pause puis dépolymérisation de nouveau (cf. **Figure S6, S6' et S6'' de l'article**). Cette séparation a permis de montrer que dans les PtK2, les doubles phosphorylations de CLIP-170 entière ou du domaine H1 provoquent préférentiellement les fréquences de sauvetage des classes 1) et 2). Par ailleurs, il semble que suivant l'acide aminé qui est phosphorylé cela favorise l'une ou l'autre des classes de sauvetage. Effectivement, la phosphorylation de la Thr25 a un effet sur les classes 1) et 2), la phosphorylation de la Thr45 favorise la classe 1), alors que la phosphorylation de la Ser147 favorise la classe 2). Ces données suggèrent que la phase de re-polymérisation des MTs dans la classe 1) est positivement impactée par la phosphorylation des Thr25 et Thr45, alors que le phénomène de pause avant une re-polymérisation dans la classe 2) serait favorisé par la phosphorylation de la Thr25 et la Ser147.

L'ensemble de ces résultats nous permet de conclure, pour la première fois, que la phosphorylation de CLIP-170 sur les Thr25, Thr45 et Ser147 augmente son activité de sauvetage microtubulaire, sans présenter d'effet additif. Nous avons aussi montré que, dans les cellules épithéliales en interphase, ces phosphorylations augmentent l'activité de sauvetage de CLIP-170, en influençant significativement après une dépolymérisation, soit les événements de re-polymérisation, soit de pause puis re-polymérisation.

III – La localisation de CLIP-170 aux microtubules n'est pas régulée par JNK

CLIP-170 est définie comme une +TIP se localisant préférentiellement au niveau des extrémités (+) des MTs en croissance (**Perez et al., 1999**), mais aussi en des points restreints laissés après le passage d'une comète CLIP-170 (rétentions) le long des MTs, correspondant la

plupart du temps à des croisements entre MTs (**De Forges *et al.*, 2016**), qui sont de futurs sites potentiels de sauvetage (**Dimitrov *et al.*, 2008**).

Malgré l'augmentation de la fréquence de sauvetage lors de la phosphorylation de CLIP-170 par JNK, le réseau microtubulaire interphasique dans les cellules PtK2 vivantes ne montre pas d'altération quelles que soient les mutations des transgènes de CLIP-170, en présence de CLIP-170 endogène (cf. **Figure 4A de l'article**). Ceci indique que la phosphorylation de CLIP-170 par JNK n'a pas d'impact sur l'organisation du réseau microtubulaire, du moins en présence de CLIP-170 endogène. De même, la modulation de l'activité de JNK avec l'anisomycine ou le SP600125 ne modifie pas le réseau microtubulaire (cf. **Figure 151 des résultats complémentaires**).

Concernant la localisation de CLIP-170 aux bouts (+) des MTs, nous avons analysé les comètes et les rétentions de CLIP-170 après le passage des comètes en fonction de l'état de phosphorylation de la protéine. Cette analyse qualitative a révélé que la localisation de CLIP-170 n'est pas modifiée par la phosphorylation de mCherry-CLIP-170 entière (cf. **Figure 4B de l'article**). Par conséquent, la phosphorylation de CLIP-170 ne semble pas avoir d'impact sur la localisation de la protéine au niveau des comètes aux bouts (+) des MTs et des rétentions le long des MTs.

Quant aux intersections microtubulaires, nous avons quantifié le nombre de croisements positifs pour CLIP-170 endogène en fonction de l'état de phosphorylation de la protéine (cf. **Figure 4C de l'article**), ainsi que de l'activation ou l'inhibition de JNK (cf. **Figure 151 des résultats complémentaires**). Cette quantification n'a pas montré de différence entre les différentes conditions de phosphorylation ou activation/inhibition de JNK et la condition contrôle. Cela suggère que la phosphorylation de CLIP-170 par JNK n'induit pas de différence de la liaison des CAP-Gly de CLIP-170 à la tubuline/MTs et que l'affinité des CAP-Gly de CLIP-170 n'est pas changée au niveau des croisements microtubulaires, qui sont de futurs sites potentiels de sauvetage.

Ces données présentées en détail dans la suite de la thèse (article en préparation et données complémentaires), suggèrent donc que la phosphorylation de CLIP-170 par JNK en condition de stress, augmente son activité de sauvetage des MTs sans pour autant modifier l'organisation du réseau des MTs interphasiques, ainsi que la localisation de CLIP-170 dans l'environnement microtubulaire.

La deuxième partie, concernant la β -tubuline est présentée à la suite des données sur CLIP-170 (cf. **page 269**).

Article :

c-Jun N-terminal kinase-
dependent phosphorylation of
CLIP-170 promotes microtubule
rescues

c-Jun N-terminal kinase-dependent phosphorylation of CLIP-170 promotes microtubule rescues

Hélène Henrie¹, Isabelle Cantaloube¹, Antoine Pilon^{1,2}, Christian Poüs^{1,3*}, Béatrice Benoit^{1*}

¹ INSERM UMR-S-1193, Univ. Paris-Sud, Université Paris-Saclay, rue Jean-Baptiste Clément, 92296 Châtenay-Malabry, France

² Biochimie, APHP, Hôpitaux Universitaires de l'Est Parisien, Site St Antoine, rue du Faubourg Saint Antoine, 75571 Paris Cedex 12, France

³ Biochimie-Hormonologie, APHP, Hôpitaux Universitaires Paris-Sud, Site Antoine Béclère, rue de la Porte de Trivaux, 92141 Clamart, France

* Correspondence to: christian.pous@u-psud.fr, beatrice.benoit@u-psud.fr

Summary:

The stress-induced MAP kinase c-Jun N-terminal kinase (JNK) controls microtubule dynamics by promoting both microtubule growth and rescues in epithelial cells, however its substrates in the microtubule environment of non-neuronal cells are largely unknown. Here, we show that the rescue factor CLIP-170 is a new substrate of JNK. Upon cells stress, it can be phosphorylated both in cells and *in vitro* on two threonine (T25, T45) and one serine (S147) residues. These residues belong to the first and to the second serine-rich regions, which flank the first CAP-Gly domain, in the head of the protein. *In vitro*, they display a differential sensitivity to JNK, and the phosphorylation of T25 is enhanced in the presence of tubulin. In epithelial cells, they present different levels of basal phosphorylation and of activation kinetics upon stress. We further evidenced that phosphomimetic mutants of full-length CLIP-170 or of its head domain alone enhance CLIP-170 capacity to promote rescue events. Strikingly, JNK-dependent phosphorylations do not modify the way CLIP-170 interacts with microtubule plus-ends, or with microtubule crossings, which are potential rescue sites, suggesting they could function by a subtle conformational change in the head domain. Together our findings reveal a novel means by which cells regulate rescue events and sustain microtubule dynamics upon various stresses.

Keywords:

+TIP, CLIP-170 (CLIP1), Phosphorylation, CAP-Gly, JNK (c-Jun N-terminal Kinase), Microtubule, Rescue, Dynamic instability, PhosTag, HeLa, PtK2, Anisomycin, SP600125, UVC, NaCl, MKK7, JNK1 α 1, JNK2 α 2

Introduction

Microtubules (MTs) are dynamic cytoskeleton elements, which result from the polymerization of α - β tubulin dimers to form polarized nanotubes. MT minus ends are often blocked at organizing centers, while MT plus-ends are free to explore the cytoplasmic space. This exploration results from a behavior termed dynamic instability (**Mitchison and Kirschner, 1984**), in which MTs alternate between phases of polymerization and depolymerization. Switches between these phases occur via transitions called catastrophes (from growth or pause to a phase of shrinking) and rescues (from shrinking to pause or to growth).

In cells, MT dynamics results from the regulation and the amplification of the intrinsic properties of tubulin by a variety of microtubule-associated proteins (MAPs). Among them, the plus end-tracking proteins (+TIPs) preferentially accumulate at growing plus ends (for reviews, see **Ferreira et al., 2014**; **Akhmanova and Steinmetz 2015**). CLIP-170 was the first +TIP ever identified and appears as comet-shaped stretches associated with growing MT plus ends (**Diamantopoulos et al., 1999**; **Perez et al., 1999**). CLIP-170 was also found to link MTs to endocytic vesicles (**Pierre et al., 1992**) and to favor MT capture by the cell cortex (**Fukata et al., 2002**). Besides its linker function, CLIP-170 was characterized as a major rescue factor *in vitro*, since its dimerized N-terminal head domain (H2) was shown to promote MT nucleation, elongation and rescues and could do so by interacting with tubulin oligomers (**Diamantopoulos et al., 1999**; **Arnal et al., 2004**). In cells, its inhibition using a dominant-negative abolishes ~80% of the rescue events (**Komarova et al., 2002**). However, little is known *in vivo* on how it functions and how it is regulated, and the relative contributions of its partner CLASP (**Akhmanova et al., 2001**), which is also a rescue factor (**Mimori-Kiyosue et al., 2005**; **Al Bassam et al., 2010**). Consistent with our finding that rescue locations match MT regions that retain a GTP-like tubulin conformation (**Dimitrov et al., 2008**), we reported recently that upon retention at the rear of +TIP comets, CLIP-170 may mark GTP-like islands. Such islands comprise architectural defects and small repaired lattice domains that record potential rescue locations in the body of MTs, especially at MT crossings (**De Forges et al., 2016**).

The N-terminal head domain of CLIP-170 contains two cytoskeleton-associated protein glycine-rich domains (CAP-Gly) flanked by three serine-rich regions. These CAP-Gly domains function in targeting CLIP-170 to MTs in cells (**Pierre et al., 1992**). They interact with the tyrosinated, acidic C-terminal tail of α -tubulin (**Peris et al., 2006**; **Mishima et al., 2007**; **Weisbrich et al., 2007**), of EB proteins (**Bieling et al., 2008**; **Dixit et al., 2009**), and with the C-terminus of the protein SLAIN2 (**van der Vaart et al., 2011**). The N-terminal domain of CLIP-170 is also binding the platform protein IQGAP1 (**Fukata et al. 2002**). The central domain of CLIP-170 is responsible for the dimerization of CLIP-170 via the formation of a coiled-coil region and for the binding of mDia via a FEED-like domain (**Henty-Ridilla et al., 2016**). In CLIP-115, a closely related homolog of CLIP-170, the beginning of the coiled coil also contains the region that allows the interaction with CLASPs

(**Akhmanova et al., 2001**). The C-terminal domain of the protein contains two zinc-knuckle motifs implicated in the interaction with other proteins (**Pierre et al., 1992**), especially CAP-Gly-containing proteins as CLIP-115, p150^{GLUED}, and itself allowing an inhibitory internal folding (**Goodson et al., 2003; Lansbergen et al., 2004**).

Phosphorylation is an important regulator of CLIP-170 function. Consistent with the finding that CLIP-170 phosphorylation alters its binding to MTs (**Rickard and Kreis, 1991**), it was found that several phosphorylations in the third serine-rich cluster promote CLIP-170 deactivation by intramolecular folding (**Lee et al., 2010**). Many other studies have reported that CLIP-170 can be phosphorylated in cells and/or *in vitro*. While some kinases like mTOR (**Choi et al., 2002**), LRRK1 (**Kedashiro et al., 2015**), Plk1/CK2 (**Li et al., 2010**) and Cdc2/Cdk1 (**Yang et al., 2009; Amin et al., 2014**) regulate positively CLIP-170 binding to MTs and/or to partner proteins, other kinases like AMPK (**Nakano et al., 2010**), PKA (**Lee et al., 2010**), PKN (**Collazos et al. 2011**) and Plk1 (**Kakeno et al., 2014**) are instead negative regulators. However no study has reported yet a control of CLIP-170 phosphorylation over its rescue factor activity.

We have shown earlier that the plus-end directed molecular motor kinesin-1 regulates interphase MT dynamics in epithelial cells in a way that involves the activation of c-Jun N-terminal kinase (JNK) to accelerate MT polymerization, and to promote rescues (**Daire et al., 2009**). JNKs, ERKs (extracellular signal-regulated kinases) and p38 belong to the mitogen-activated protein kinases (MAPKs) superfamily, activated during development and upon diverse stresses (for review, see **Davis, 2000**). JNKs are serine/threonine kinases, which phosphorylate consensus serine-proline or threonine-proline motifs. They are activated by a dual threonine and tyrosine phosphorylation by upstream protein kinases (MKK4 or MKK7), which are brought in proximity of JNK thanks to the scaffolding proteins of the JIP family (for reviews, see **Zeke et al., 2016; Hotamisligil and Davis, 2016**). JIPs being cargoes of kinesin-1, favors local JNK activation via a kin/JIP/JNK pathway (**Verhey et al., 2001; Daire et al., 2009**). Many neuron-specific MAPs are known as JNK substrates and could explain the effects of JNK in controlling MT growth or stabilization in neurons (for review see **Zeke et al., 2016**). However, no effector of JNK expressed in epithelial cells could be proposed to control MT dynamics, especially the effectiveness of rescues.

Here, we show that CLIP-170 is mainly phosphorylated by JNK in its N-terminal domain, in the serine- and threonine-containing regions that flank the first CAP-Gly domain. We also report that three of these phosphorylations have *in vitro* different kinetics and are favored by the binding of tubulin to the CAP-Gly domains of CLIP-170. In cells, these phosphorylations increase the rescue-promotion activity of CLIP-170 by selectively acting on the transitions leading to MT regrowth, without affecting its binding to MTs. This study thus provides a new insight into how rescue promotion by CLIP-170 is regulated by JNK-dependent signaling.

Experimental procedures

Plasmids, antibodies, cell culture and treatment

The sequence of human CLIP-170 N-terminal domain (NP_002947 NCBI) from amino acids 1 to 347 (H1 domain) was aligned with corresponding CLIP-170 sequences of mouse (*mus-musculus*; NP_001334397), rat-kangaroo (XM_013023065; SRP055986, **Udy et al., 2015**), rat (NP_113933), and chicken (NP_990273.1), using the software Clustal Omega (EMBL-EBI). PtK2 cells stably expressing GFP-tubulin were a gift of A. Khodjakov. HeLa and PtK2 cell lines were cultured in DMEM (Gibco), supplemented with 10% fetal calf serum (Sigma) and 1% antibiotic-antifungal mixture (Gibco), except for PtK2 cells, which are sensitive to antibiotics. Human GFP-H1 (**Pierre et al., 1992**), mCherry-CLIP-170 (**De Forges et al., 2016**), Flag-MKK7-JNK1 α 1 and 2 α 2 (**Lei et al., 2002**, Addgene) plasmids were transfected with Turbofect (Thermo Scientific) or JetPEI (Polyplus transfection) 24h or 48h prior to analysis (Western-blot and whole cell imaging, respectively). The polyclonal anti-CLIP-115/170 (#16234 directed to the N-terminal region) and anti-CLIP-170 antibodies (#16134 directed to the C-Terminal) were a gift from F. Perez. Anti- α -tubulin (DM1A) was from Sigma. HRP-mouse and -rabbit secondary antibodies were from Cell Signaling. Cell treatments were performed by adding 0.1% DMSO, 1.2 μ M Anisomycin (up to 1h), 350 mM NaCl (1h), 20 μ M SP600125 (Enzo), 10 μ M U0126 or 10 μ M SB203580 (Sigma) to the culture medium or by exposition to 200 J/m² UVC (10 min followed by 50' recovery).

Site-directed mutagenesis

Human GFP-H1 and mCherry-CLIP-170 mutants were produced by PCR using a site-directed mutagenesis kit (QuickChange® Lightning Site-directed, Agilent technologies). A T186A mutation was made in all the GFP constructs, with the following primer pairs: forward 5'-TCAACTAGCAGACCATTATCAACAA-AATCTCCAATTGGCGATG-3' and reverse 5'-CATCGCCAATTGGAGC-ATTTTGTGATAATGGTCTGCTAGTTGA-3' (underlined nucleotides indicate mutated sites). For CLIP-170 mutations, primer pairs were as follow: for-T25A 5'-AGCACAGCTCTGAAGGCACCTACGGCTGTTG-3' and rev-T25A 5'-CAACAGCCGTAGGTGCCTTCAGAGCTGTGCT-3', for-T25E 5'-GGAAGCACAG-CTCTGAAGGAACCTACGGCTGTTGTAGC-3' and rev-T25E 5'-GCTACAACAG-CCGTAGGTTCCTTCAGAGCTGTGCTTCC-3', for-T45A 5'-AGTGAAAAAGCATCA-AGCGCTCCATCATCTGAGACTC-3' and rev-T45A 5'-GAGTCTCAGATGATGGAG-CGCTTGATGCTTTTTCACT-3', for-T45E 5'-TCCAGTGAAAAAGCATCAAGCGAG-CCATCATCTGAGACTCAGGAG-3' and rev-T45E 5'-CTCCTGAGTCTCAGATGA-TGGCTCGCTTGATGCTTTTTCACTGGA-3', for-S147A 5'-CTCCCGAGCTACTG-CACCGCTGTGCAC-3' and rev-S147A 5'-GTGCACAGCGGTGCAGTAGCTCGG-GAG-3', for-S147E 5'-CTCCCGAGCTACTGAACCGCTGTGCACTTC-3' and rev-S147E 5'-GAAGTGCACAGCGGTCAGTAGCTCGGGAG-3', for-S312A 5'-GAAGC-GCAGCCCTGCTGCCTCTTCCCT-3' and rev-S312A 5'-AGGGAAGAGGCAGCAGG-GCTGCGCTTC-3'. Mutagenesis was verified by DNA sequencing.

Immunoprecipitation and *in vitro* kinase assay

For the *in vitro* kinase assays, GFP-H1 proteins were purified from transfected HeLa cells using GFP-trap® beads (Chromotek), and were re-suspended in PEM pH 6.9 (80 mM PIPES pH 6.9, 1 mM EGTA, 2 mM MgCl₂) buffer, supplemented with 150 mM NaCl, 0.25 mM DTT, 0.1 mM EGTA, 5 mM ATP (Sigma), 25 mM MgCl₂, 25 mM β-Glycero-Phosphate, and 1 mM Na₃VO₄. In the kinase assay, immunoprecipitated GFP-H1 protein (1 μg/μl) bound to GFP-trap® beads was incubated at 30°C for 60 min with or without recombinant active GST-JNK1α1 (100 ng, Sigma; with spontaneous activity decay) (protocol adapted from **Raingaud et al., 1995**; **Zhang et al., 2001**; **Huang et al., 2003**; **Nakano et al., 2010**). Tubulin purified from porcine brain (Cytoskeleton) (1.8 or 3.7 μg/μl) was added or not to the assays either in GTP- or in GDP-loaded forms. GDP-tubulin was prepared as follows: MTs obtained by the assembly of stock tubulin (20 min, 37°C) without the addition of nucleotide were pelleted (25 000 g, 15 min, 37°C), and then sheared and resuspended in nucleotide-free, cold PEM buffer (30 min, 4°C). To detect tubulin that was bound to H1 after the *in vitro* kinase assay, the beads were washed 3 times with PEM buffer prior to Western-blot analysis.

Live-imaging and analysis of MT dynamics and Immunofluorescence

Parameters of MT dynamics were determined on living PtK2 or HeLa cells according to **Dhamodharan and Wadsworth (1995)**. Time-lapse sequences were acquired on a Leica DMLB microscope through a 100x 1.3 NA objective, using a Scion CFW1312M CCD camera and homemade software. After noise attenuation using a mild Kalman stack filter in imageJ, MTs were tracked manually. Dynamic parameters were computed using Microsoft Excel. GraphPad Prism® v5 software was used for statistical analysis and plotting. For CLIP-170 analysis in fixed cells, cells expressing mCherry-CLIP-170 mutants were cultured on glass coverslips. After washing with 37°C PEM they were fixed using -20°C methanol supplemented with 1mM EGTA for 10 min and then 4% paraformaldehyde for 15 min. Cells were incubated with 0.15% Triton X100 in PBS for 5 min, then with 1% BSA, 0.1% Tween-20 in PBS for 10 min. Tubulin labeling with anti-α-tubulin was performed in PBS containing 1% BSA and 0.1% Tween-20 (1h, 37°C). After three washes with PBS containing 0.05% Tween-20, incubation with the secondary antibody conjugated to Alexa 488 (Molecular Probes) was performed in PBS containing 1% BSA and 0.05% Tween-20 for 45 min at 37°C (protocol adapted from **Coquelle et al., 2002**).

Phos-Tag and Western blotting

To visualize the migration shifts of GFP-H1 mutants, we used 6 % polyacrylamide SDS gels containing 20 μM Phos-tag™ (Wako) and 40 μM MnCl₂. Gels were run 1h 30min at 150V in a BIO-RAD Mini-Protean™ II system kept in the dark. PageRuler prestained protein ladder (Thermo Scientific) was used to follow migration. Tris/HCl and PEM buffers used in the *in vitro* kinase assay were diluted 5 times in water before deposition on Phos-Tag gels. After migration, gels were incubated for 15 min

in transfer buffer containing 1mM EDTA to chelate Mn²⁺ cations before transfer. To visualize the shifts of endogenous CLIP-170, we used 6 % acrylamide SDS gels, run 1h 30min at 150V at RT, then for 1h at 4°C. Quantifications of scanned Amersham Hyperfilm ECL (GE Healthcare) were performed with Image-J, and Microsoft Excel software was used for plotting. The statistical analyses were done with GraphPad Prism® v5 software.

Statistical analysis

The means ± S.D or S.E.M of at least three independent experiments were represented as histograms (with Microsoft Excel or GraphPad Prism® v5 software). Statistical comparisons were performed using Mann-Whitney test on GraphPad Prism® version 5.0 software. The followed symbols were used: ns for not significant, * means p<0.05, ** means p<0.01, and *** means p<0.001.

Results

CLIP-170 is a new substrate of JNK *in vivo*

To understand how JNK can enhance MT rescue frequency, we have tested whether the rescue factor CLIP-170 is actually a new substrate of the kinase. The 9 putative sites (S/P or T/P) for CLIP-170 phosphorylation by JNK are all located in the N-terminal domain of the protein (H1 domain). These sites, which are highlighted in grey in **Figure 1A**, flank the two CAP-Gly (boxed) domains, which allow CLIP-170 interaction with tubulin or with EB proteins (**Mishima et al., 2007; Weisbrich et al. 2007**). Among these sites, 4 are conserved between species (**Figure 1A**). CLIP-170 has already been described to be phosphorylated by various kinases in its head domain (**Yang et al., 2009; Lee et al., 2010; Nakano et al., 2010; Collazos et al. 2011; Kakeno et al., 2014**). When located in the third serine-rich domain (beyond the second CAP-Gly), these phosphorylations were shown to negatively affect CLIP-170 by favoring autoinhibition, CLIP-170 comet shortening and thus loss of interaction with MTs. When they did not yield a similar phenotype, mutations in the second serine-rich domain had grossly no effect on CLIP-170 comet (**Lee et al., 2010**). Preliminary mass spectrometry analyses (data not shown) prompted us to focus on the phosphorylation of 2 putative sites by JNK, T25 and S147, which are located in the first and the second serine-rich domains, respectively. These preliminary studies also revealed that in the GFP-H1 fusion protein we used throughout this study, the T186 of GFP was a target of JNK-mediated phosphorylation. Thus, when expressing a CLIP-170 H1 fused with GFP, the latter was systematically mutated into GFP^{T186A}-CLIP-170-H1 (hereafter termed GFP-H1).

To analyze the phosphorylation of endogenous CLIP-170 by JNK, we have first treated HeLa cells with anisomycin to stimulate the JNK pathway, and combined this stimulation with MAPK inhibitors that specifically target ERK, p38 or JNK. Trying to detect changes in the phosphorylation status of the entire protein by a retardation

in protein migration on SDS-PAGE revealed no apparent shift upon anisomycin treatment alone (**Figure 1B**). MAPK inhibition prior to and during the course of the anisomycin treatment caused a moderately accelerated migration of CLIP-170, only upon JNK inhibition, not upon the inhibition of ERK or p38 (**Figure 1B**). This first observation suggested that the level of CLIP-170 phosphorylation is already high in living cells. The same experiment performed on PtK2 cell lysates failed to reveal migration shifts (Figure S1), suggesting also that gel shifts of the full-length protein in conventional SDS-PAGE was not appropriate to detect phosphorylation properly.

To increase sensitivity in the detection of phosphorylation, we moved to the study of GFP-H1 in gel retardation assays using Phos-Tag[®]. In parallel of T25 and S147, we explored the phosphorylation of S312, which belongs to the third serine cluster beyond the second CAP-Gly, and which was already shown to control CLIP-170 folding and autoinhibition. To reveal the phosphorylation on a given site, we used GFP-H1 that we mutated into Ala on the two other sites (S147A-S312A to detect T25 phosphorylation; T25A-S312A to detect S147 phosphorylation; T25A-S147A to detect phosphorylation of S312). The triple A mutant was used as a negative control. Cells that expressed these GFP-H1 mutants were subjected to a time course of anisomycin treatment. Gel retardation analysis of GFP-H1 migration showed a time-dependent phosphorylation of T25 (**Figure 1C, 1C', left panels**). In contrast, the phosphorylation of S147, which was already high prior to the treatment increased moderately only after 30 min as indicated by the ratios of phospho-GFP-H1 to non-phosphorylated GFP-H1. The phosphorylation of S312 did not evolve at all (**Figure 1C, 1C', left panels**). These results indicated that in cells, GFP-H1 is much more phosphorylated on S147 than on T25 and S312 in basal conditions. Upon anisomycin treatment, the phosphorylation of T25 was stimulated earlier than that of S147.

To confirm that the phosphorylations of T25 and S147 are mediated by JNK, effective anisomycin treatments were combined with MAPK inhibitions. Consistent with the results in **Figure 1B**, T25 phosphorylation was hardly detected after JNK inhibition. Also, the increase in the phosphorylation of S147 was specifically attributable to JNK (**Figure 1C, 1C', middle panels**). In pathophysiology, JNK activation is expected to result from a variety cell stresses. Acute stresses were thus performed by briefly exposing cells to UVC or treating them with excess NaCl. As shown in **Figure 1C, C' (right panels)**, these conditions led to the occurrence of a proportion of CLIP-170 phosphorylated on T25 and on S147. The increase in both phosphorylated forms was prevented by JNK inhibition (**Figure 1C, C'**). Finally, to ascertain that CLIP-170 phosphorylations on T25 and S147 specifically involved JNK, kinase activity was boosted by overexpressing constitutive active constructs that consisted of JNK1 or JNK2 fused to MKK7, one of their upstream MAPKK. The negative control consisted in overexpressing the JNK1 construct in which the TPY motif phosphorylated by MKK7 was mutated into the non-phosphorylatable motif APF. As cells overexpressing constitutive active JNKs were stressed for much longer periods of time (24h) than shown above in **Figure 1D, D'**, the phosphorylation of GFP-H1 occurred on additional sites. Among them, we identified T45, but residual phosphorylation on other site(s) (X) could also be detected. **Figure 1D, D'** shows that

sustained JNK activation, as expected did not phosphorylate S312, while it elicited the same level of phosphorylation of S147 compared to short stresses and almost doubled the level of phospho-T25.

Together, these experiments indicate that among all the potential sites of CLIP-170 phosphorylation by MAPK, which are all located in the H1 domain of the protein, JNK specifically phosphorylates serine and threonine residues in consensus SP and TP motifs, in the first and in the second serine-rich regions that flank the first CAP-Gly domain. Acute JNK activation phosphorylates T25 and S147 (which displays a high level of basal phosphorylation), while sustained JNK activation further phosphorylates T45 and other unidentified sites.

Phosphorylation of CLIP-170 (H1) by JNK *in vitro*

To test whether the H1 domain of CLIP-170 is directly phosphorylated by JNK, we incubated WT or mutant GFP-H1 purified from HeLa cells by GFP-Trap® with or without recombinant active GST-JNK1 α 1. As the amino-acids we found to be phosphorylated by JNK *in vivo* flank the first CAP-Gly domain of CLIP-170, we also performed the *in vitro* phosphorylation experiments in the presence of purified tubulin. Two sets of experiments were carried out with series of mutants that allowed (**Figure 2B**) or not (**Figure 2A**) the identification of H1 phosphorylated on T45.

Given that recombinant active GST-JNK1 α 1 requires *in vivo* phosphorylation, its kinase activity is fragile. Therefore, we observed that recently prepared kinase batches exhibited higher activity (high JNK1) than older ones (low JNK1). Taking advantage of this difference, we found that T25 phosphorylation was complete using high JNK1 condition (**Figures 2A and 2B**). The same experiments performed in low JNK1 condition showed that the band of phospho-T25 GFP-H1 occurred only in the presence of tubulin (**Figure 2A**). **Figures 2A and 2B** also show that the H1 domain of CLIP-170 is already partly phosphorylated on S147 and that an increase in phosphorylation could be observed in high JNK1 conditions. Unlike what we observed with T25 however, the addition of tubulin dimers did not reproducibly facilitate S147 phosphorylation (**Figure 2A, 2B**). High JNK1 activity was required to observe H1 phosphorylation on T45, in conditions that were not affected by the presence of tubulin (**Figure 2B**). As expected, S312 was not phosphorylated by JNK *in vitro* (**Figure 2B**). It is noteworthy that, like shown *in vivo* with sustained JNK activity; high JNK1 also phosphorylated additional unidentified residues (X in AAAA mutants, **Figure 2B**).

As the addition of tubulin to the assays was important to enhance the phosphorylation of T25, we checked that a fraction of tubulin bound on the beads could be detected at the end of a phosphorylation assay, mostly when GFP-H1 was present (**Figure S2**). This further suggested that tubulin stably interacted with the H1 domain during the assay. To get further insight into how tubulin could contribute to facilitate H1 phosphorylation by JNK, we also repeated phosphorylation experiments, using either GTP- or GDP-bound tubulins (**Figure S3**). The gel retardation analysis showed again that only T25 phosphorylation but not that of S147, was sensitive to

the presence of tubulin. This assay also showed that both GDP and GTP-tubulin could promote phosphorylation.

Together, this set of data confirms that the phosphorylations of T25, S147 and T45 we observed in cells are directly operated by JNK. While the phosphorylation of T25 is sensitive to the interaction of H1 with tubulin, those of S147 or T45 are not.

JNK-mediated phosphorylations of CLIP-170 stimulate microtubule rescues

To determine the functional relevance of JNK-dependent phosphorylations of CLIP-170, we tested whether they influenced the capacity of CLIP-170 to stimulate MT rescues. To this end, we studied in parallel the effects of non-phosphorylatable and of phosphomimetic mutants of full-length CLIP-170 and of its H1 head domain. MT dynamic instability was recorded in PtK2 cells stably expressing GFP-tubulin when cells overexpressed full-length mCherry-CLIP-170. Otherwise, when cells (PtK2 and HeLa) overexpressed the GFP-H1 fusion proteins, H1 localized both to growing plus ends and all along the MT bodies, making the GFP-tubulin expression unnecessary to follow dynamics. We focused our functional study mainly on T25 and S147 the residues phosphorylated early upon acute JNK activation. As shown in **Figure S4**, we first checked that PtK2 cells were capable of phosphorylating the H1 domain of human CLIP-170 on T25, and S147 in a JNK-dependent manner.

Next, we analyzed the four main parameters of dynamic instability and plotted the mean values normalized relative to WT values in diamond graphs (**Lacroix et al., 2014; Figure 3A and Figure S5**). These graphs showed that MT growth speed was almost unaffected by CLIP-170 or H1 phosphorylation. The mean shrinking speed and the catastrophe frequency varied in a way that was more heterogeneous, depending on the cell type studied and on whether the full-length CLIP-170 or the H1 domain was overexpressed and on the type of mutations considered. Most importantly, the rescue frequency increased when single E (**Figure S5**) and double E mutants were expressed; and it decreased to a lesser extent with the corresponding A mutants (**Figure 3A and S5**). Focusing in more detail on rescues, the comparison of single or double A and E mutants on T25, T45 and S147 revealed that the phosphomimetic mutants always caused higher rescue frequencies than non-phosphorylatable ones, as shown in the box plots of **Figures 3B and 3B'**. The same conclusions could be drawn from examination of spatial rescue frequencies although their distributions were wider. Rescue events represent all the transitions that caused an interruption of MT shrinking. However, they could be grouped into 3 categories: the rescues in which growth resumption immediately followed the interruption of shrinking (**Figure S6**), those in which a pause preceded the phase of regrowth (**Figure S6'**), and those in which shrinking was only paused transiently (**Figure S6''**). Examining the effects of our mutants on the rescue frequencies in each category further revealed that the difference between the effects of the E and A mutants could only be detected when MT regrowth occurred after shrinking interruption, either immediately or after a pause.

Together, these results indicate that CLIP-170 phosphorylation on T25 and S147 and also on T45 increase the frequency of rescue. Our results also indicate that the phosphorylation of CLIP-170 would not contribute to stop MT disassembly but rather to promote MT regrowth.

JNK-mediated phosphorylations of CLIP-170 do not impact the microtubule network organization or change the way CLIP-170 interacts with microtubules

Although it prevented MT rescues, CLIP-170 inhibition alone did not affect the organization of the MT network (**Komarova et al., 2002; Daire et al., 2009**). Accordingly, the overexpression of the double non-phosphorylatable mutants or that the double phosphomimetic mutants did not affect the MT network (**Figure 4A**). The MT network displayed a normal density and organization when cells expressed the full-length AA and EE CLIP-170 mutants. As the overexpression of full-length CLIP-170 often generates numerous intracellular dots beside comets (**Perez et al., 1999**), we further tested that the H1 domains harboring the same AA and EE mutations did neither affect the network's density and organization. In these conditions the H1 domains of CLIP-170 distributed all along the MT bodies, with reinforcement at the tips of growing MTs (**Figure 4A, right panel**).

A characteristic behavior of full-length CLIP-170 is the frequent retention of the protein at the trail of plus end comets (**Perez et al., 1999**). We have shown recently that this behavior frequently occurs at MT crossings and at locations where MT lattice defects can be detected (**De Forges et al., 2016**). These defects, which correspond to GTP-like islands generated by shifts in the number of protofilaments, damages, or mechanical constraints in the MT lattice, are privileged hotspots for potential rescues (**Dimitrov et al., 2008; De Forges et al., 2016**). The behavior of mCherry-CLIP-170 T25 and S147 mutants are shown in the time-lapse sequences of **Figure 4B**. CLIP-170 recruitment into comets was not affected by the double A or by the double E mutations. It also clearly appears that both kinds of comets left multiple trailing dots that transiently persisted after their passage. Further examination of CLIP-170 localization after cell fixation showed that both mutants were able to accumulate at MT crossings in the same proportion (**Figure 4C**).

These experiments show that the mutations that render CLIP-170 non phosphorylatable by acute JNK activation or that mimic these phosphorylations to control rescues, do not affect the way CLIP-170 interacts with the MTs, either by forming comets at the tips of growing MTs, or by leaving trailing dots at MT crossings. Therefore, the mechanism of rescue stimulation by phosphorylation cannot be attributed to a change in the way CLIP-170 binds to MTs, but would rather involve a subtler conformational change.

Discussion

Previously, we have demonstrated that the kinesin-1/JNK signaling pathway modulates MT dynamics by increasing MT growth as well as rescue frequency (**Daire et al., 2009**). Here, we show that CLIP-170, which is a major rescue factor (**Komarova et al., 2002**), functions downstream of the JNK pathway to regulate MT dynamics in interphase of epithelial cells. JNK directly phosphorylates CLIP-170 H1 domain upon various cellular stresses. We show that these phosphorylations positively impact CLIP-170 rescue activity, without changing the way CLIP-170 is recruited into tip tracking comets and MTs crossings in cells.

Most of the CLIP-170 phosphorylations described so far affect its affinity for MTs or other partners. These phosphorylations are caused by an increasing variety of kinases. They may cause CLIP-170 release from the MT lattice (**Rickard and Kreis, 1991**), higher recruitment to MTs mediated by mTOR (**Choi et al., 2002**), increased localization to MT plus ends in G2/M controlled by Cdc2 (**Yang et al., 2009**) or to kinetochores after phosphorylation by Plk1 and CK2 (**Li et al., 2010**) or by Plk1 and Cdc2 (**Amin et al., 2014**). Phosphorylations may also increase auto-inhibition of CLIP-170 that prevents its binding to tyrosinated MTs (**Nirschl et al., 2016**), upon phosphorylation by AMPK (**Nakano et al., 2010**), PKA (**Lee et al., 2010**), Plk1 (**Kakeno et al., 2014**) or PKN (**Collazos et al., 2011**). Furthermore LRRK1-dependent phosphorylation in the C-terminal domain was shown to regulate CLIP-170 capacity to interact with dynein/dynactin complexes without affecting its interaction with MTs (**Kedashiro et al., 2015**). Similarly, our findings reveal a new mechanism of control over CLIP-170 function that depends on JNK in the regulation of CLIP-170 rescue activity, without changing the way it distributes on MTs.

Until now, only one example of phosphorylation had been demonstrated in the second serine-rich domain of the protein on S195, as a result of Plk1 action. It has been shown to function as a priming phosphorylation for the action of CK2 in the C-terminal domain of CLIP-170, to facilitate binding to kinetochores (**Li et al., 2010**), but no information exists about a possible modulation of CLIP-170 rescue function. Here, we provide evidence that human CLIP-170 phosphorylation specifically catalyzed by JNK mainly occurs on the T25, T45 and S147 residues of the H1 domain, within canonical SP or TP motifs. S147 belongs to the second serine-rich domain and is conserved between species, while T25 and T45, which belong to the first serine-rich domain are not. These residues exhibit differential sensitivity to phosphorylation. While S147 already displays a high basal phosphorylation level, JNK activation primarily targets T25, then it enhances the phosphorylation of S147 and finally that of T45 upon sustained kinase activity. In other terms, CLIP-170 phosphorylation by JNK may reflect the intensity and the duration of the kinase activation and hence of the cell stress. During this study, we also verified that another residue (S312), which belongs to the third serine-rich domain and also displays a proportion of basal phosphorylation, is not phosphorylated by JNK. This is not surprising because the effect of S312 phosphorylation is to promote the auto-inhibition of CLIP-170 in

response to PKA, AMPK or PKN (**Nakano et al., 2010; Lee et al., 2010; Collazos et al., 2011; Kakeno et al., 2014**).

Our *in vitro* assays revealed not only that JNK functions directly to phosphorylate CLIP-170, but also that the presence of tubulin, which could bind to the H1 domain, can enhance the effectiveness of phosphorylation. CLIP-170 has been shown previously to interact with tubulin oligomers to form protofilament rings (**Arnal et al., 2004**), with a preferential affinity for GTP-tubulin over GDP-tubulin, as established with the dimeric H2 domain (**Diamantopoulos et al., 1999**). Such interaction could in turn favor CLIP-170 copolymerization with tubulin into MTs and could contribute to the mechanism of rescues (**Arnal et al., 2004**). Interestingly, our results show that the capability of CLIP-170 to interact with tubulin dimers or with oligomers is not restricted to the dimeric H2 domain, but also functions with the monomeric H1 domain to promote its JNK-dependent phosphorylation. Our experiments further suggest that the nucleotide state of tubulin might not be as important for H1 phosphorylation as for the formation of oligomers with H2. The binding of CLIP-170 to tubulin might thus not only be a way to prepare tubulin for assembly into MTs, but also a means to stabilize a conformation of CLIP-170 that could enhance its rescue effect.

JNK-dependent phosphorylation of CLIP-170 appears as a novel means to regulate its rescue promotion effect. The molecular mechanisms by which rescues could occur at the plus ends of shrinking MTs were long considered as purely stochastic. However, we have shown previously that the locations of GTP-islands along MTs correlate with the occurrence of rescues (**Dimitrov et al., 2008**). Also, accumulation at MT crossings of either repaired damages (**Aumeier et al., 2016**), architectural defects or mechanical constraints (**De Forges et al., 2016**) can promote rescues, strongly indicating that potential rescue locations are generated during MT's life and recorded within the MT lattice. To promote effective rescue in cells, we proposed that CLIP-170 recognizes this variety of features and defects, called GTP-like islands, and showed accordingly that it accumulates at MT crossings (**De Forges et al., 2016**). The mechanisms of GTP-like islands recognition by CLIP-170 are not yet understood. From our data, CLIP-170 phosphorylation by JNK does not change the way CLIP binds to MTs to form comets. It has been proposed that comet formation is the consequence of CLIP-170 recruitment via the C-terminus of EB proteins (**Bieling et al., 2008; Dixit et al., 2009**), of SLAIN2 (**van der Vaart et al., 2011**) and of its interaction with the tyrosinated C-terminal tail of α -tubulin (EEY/F) (**Peris et al., 2006**). Our data suggest that the affinity of CLIP-170 for EBs, SLAIN2, and tubulin are not changed by JNK. CLIP-170 phosphorylations by JNK neither changed the proportion of MT crossings that were recognized by CLIP-170, further suggesting that its interaction with tubulin was not modulated. Therefore we can not explain the gain of rescue activity in presence of JNK by an enhanced CLIP-170 recruitment into tip tracking comets and MTs crossings in cells. Instead, we speculate

that the activity of the rescue factor is itself regulated by JNK, rather than its cellular distribution.

Therefore, we may infer that changes in the conformation of the non-structured domains of CLIP-170 that flank its first CAP-Gly domain could be the reason of rescue enhancement. Such changes could tune the spatial orientation of the two CAP-Gly bearing tubulin dimers/oligomers to facilitate the switch to a MT re-growth phase. This hypothesis is also supported by our data showing that only rescues that end up with MT re-growth are stimulated, not those in which MT disassembly is transiently interrupted. In cell rescue promotion involves not only CLIP-170, but also CLASPs which are recruited to MTs both by interaction with CLIPs (**Akhmanova et al., 2001**) and with EBs through the interaction via their SxIP motifs (**Maki et al., 2015**). However CLASP binding to CLIP-170 relies on a domain which is almost completely absent in H1, a central region in the first part of the coiled coil (**Akhmanova et al. 2001**). Therefore, as the phosphomimetic mutants of H1 promoted rescues to a similar extent as full-length CLIP-170, it is very likely that rescue promotion by JNK does not imply CLASP as binding partner. Instead it will be possible that JNK-induced CLIP-170 phosphorylations increase recruitment of the MT polymerase ch-TOG, *via* the recruitment of SLAIN2 by the H1 domain (**van der Vaart et al., 2011; Nakamura et al. 2012**) allowing easier regrowth of MT by enhancing local tubulin dimers concentration at future rescue sites.

The finding that JNK can stimulate rescues by phosphorylating the major rescue factor CLIP-170 represents a novel regulatory mechanism that would allow cells to preserve the dynamics and integrity of their MT network upon a variety of cell stresses. JNK activation could be spatially facilitated in the MT environment near the plus ends upon transport by kinesin-1 motors, *via* the recruitment of the upstream MAPK pathway of JNK by the scaffolding protein JIP-1 (**Verhey et al., 2001; Daire et al., 2009**). By allowing local activation of the kinesin-1/JNK pathway, MTs would therefore contribute to their own maintenance and to the increase of their own lifespan by enhancing the amount of CLIP-170-mediated rescue.

Figure legends

Figure 1. The phosphorylation of CLIP-170 on T25, T45 and S147 residues are mediated by JNK upon various cell stresses. (A) Conservation of CLIP-170 N-terminal domain (H1 domain) in five species. Identical residues are indicated with stars, while similar residues are marked with 1 or 2 dots. The 9 consensus sites for MAPK/JNK are highlighted in grey, with T₂₅P, T₄₅P and S₁₄₇P sites in bold. The two CAP-Gly domains are boxed, as well as known phosphorylation sites for Plk1 (S195), Cdc2 (T287), and AMPK/PKA/Plk1/PKN (S312). **(B)** Western-blot of endogenous CLIP-170 in HeLa cells (n = 4). The JNK_{1/2} inhibitor SP600125 (20 μM) but not the other MAPKs inhibitors (10 μM U0126 MEK/ERK_{1/2} inhibitor, 10 μM SB203580 p38α,β inhibitor), accelerates CLIP-170 mobility in SDS-page. Cells were pretreated with inhibitors 2h or DMSO 0,1% (-), before addition of 1.2 μM anisomycin (1h for JNK activation). **(C)** Phos-Tag™ Western-blot of GFP-H1 showing the phosphorylations of T25, S147 and S312 upon various cell stresses combined or not with MAPK pathways inhibitions. HeLa cells were transfected with the indicated GFP-H1 mutants. Stresses were induced by treatments with 1h or the indicated kinetic 1.2 μM anisomycin, 10' UVC (200J/m² followed by 50' recovery), or 1h NaCl (350 mM). For MAPK inhibitions, cells were pre-treated for 2 h with 0.1% DMSO (-), 10 μM U0126 (ERK), 10 μM SB203580 (p38) or 20 μM SP600125 (JNK). The inhibitors were kept in the medium during cell stress induction. The migrations of phosphorylated and of non-phosphorylated (o) GFP-H1 are indicated on the right. The percentages of phospho- to unphosphorylated-forms are indicated below each gel (P%). Only JNK inhibition specifically counteracts phosphorylations on T25 and S147. The Western-blot was probed using anti-CLIP-170 N-terminal region antibody. **(C')** Quantification and statistical analysis of data from **C** are shown in histograms as the mean ± SD values of time-course experiments (n = 4), inhibition of anisomycin-induced stress (n = 4), of UVC or NaCl-induced stress (n = 3). Comparisons were performed using Mann-Whitney test, * p < 0.05, ns = not significant. **(D)** Phos-Tag™ Western-blot of GFP-H1 showing phosphorylation of T25, T45, S147, S312 and of additional unidentified site (X-P) upon sustained JNK-activation. HeLa cells were co-transfected with the indicated GFP-H1 phospho-mutants and with the Flag-MKK7-JNK fusion plasmids 24h prior to phosphorylation analysis. APF denotes the fusion protein in which the TPY activation-motif is mutated into the non-phosphorylatable APF motif (Flag-MKK7-JNK1α1^{APF}). WT1 and WT2 denote the constitutively active constructs Flag-MKK7-JNK1α1^{WT}, or Flag-MKK7-JNK2α2^{WT} of JNK1 and JNK2. **(D')** The histogram shows the quantification of the mean ± SD from 3 independent experiments shown in **D**.

Figure 2. JNK phosphorylates the head domain of CLIP-170 on T25, T45 and S147 in vitro. (A-B) *In vitro* kinase assays were performed using mouse recombinant activated GST-JNK1α1 (with high or low JNK1 activity) and mutated GFP-H1 purified from HeLa cells by GFP-Trap®. Porcine brain tubulin loaded with

GTP was added as indicated. Phosphorylations were analyzed by Phos-Tag™ gel retardation assays and Western-blotting probed using anti-CLIP-170 head domain antibody. Tubulin levels added were checked by Western-blot. **(A)** With high JNK1 activity the number of independent experiments carried out to visualize T25 and S147, S312 phosphorylations were respectively of 3, 2 and 1. In presence of JNK an additional phosphorylation site was present (often visible as doublet with T25 and S147), most likely corresponding to T45 phosphorylation. With low JNK1, 3 independent experiments were performed for the phosphorylations of T25 and S147, and 1 for S312 and X. **(B)** With high JNK1 activity, 1 experiment was carried out to visualize T25, T45, S147 and S312 phosphorylations, revealing an additional uncharacterized phosphorylation-site (X), more or less visible as doublet with T25, T45 and S147.

Figure 3. JNK-dependent phosphorylations of full length CLIP-170 or of its H1 domain increase MTs rescue frequency. MT dynamics parameters were determined from time-lapse imaging of living PtK2 (stably expressing GFP- α -tubulin or not) or HeLa cells expressing wild type (WT), non-phosphorylatable (A) or phosphomimetic (E) CLIP-170 transgenes. Full-length mCherry-CLIP-170 mutants were transiently expressed in PtK2-GFP- α -tubulin (n = 3). GFP-H1 mutants were expressed in PtK2 (n = 3) or in HeLa cells (n = 1). **(A)** Diamond graphs of MT dynamic instability parameters (S and G for shortening and growth speeds, R and C for rescue and catastrophe time frequencies) of double mutants T25-S147 (AA or EE) were normalized relative to WT controls (see **Table I** for actual values). The numbers of MTs and of cells that were analyzed are indicated in each table. **(B-B')** Box plot quantifications of the temporal and of spatial rescue frequencies presented in **A**, plus those obtained with single mutants T25, S147 (n = 3) and T45 (n = 1). The numbers of MTs and of cells examined are indicated. Comparisons were performed using Mann-Whitney test, * p < 0.05, ** p < 0.01, *** p < 0.001, ns = not significant.

Figure 4. Mutations on T25 and S147 do not affect the way CLIP-170 binds to microtubules. **(A)** Living PtK2 cells stably expressing GFP- α -tubulin and overexpressing mCherry-CLIP-170 or PtK2 cells overexpressing GFP-H1 phospho-mutants (n = 3), showing unchanged MT network organization with T25-S147 AA or EE. **(B)** Time-lapse images of mutated mCherry-CLIP-170 comets and remnants observed in PtK2 transiently transfected cells. CLIP-170-T25-S147 AA or EE comet fragmentation events are pointed with white arrowheads (n = 3). **(C)** Immunostaining of HeLa cells overexpressing mCherry-CLIP-170 mutants (red) with anti- α -tubulin antibody (green) (n = 2). The histogram shows the mean \pm SD of the percentage of CLIP-170-positive intersections for T25-S147 AA or EE.

Table I. Parameters of microtubule dynamics in PtK2 and HeLa cells. Quantification of the MT dynamic instability parameters computed from live cell

imaging of HeLa or PtK2 cells stably expressing GFP- α -tubulin or not. Cells transiently expressed GFP-H1 or full-length mCherry-CLIP-170 wild type (WT), or phospho-mutants (A or E) for 48h. The data are expressed as mean \pm SD of individual MT values. Durations are expressed in s, distances in μ m and speeds in μ m/min.

Supplemental figure legends

Figure S1 (related to Figure 1B). Western-blot of endogenous CLIP-170 in PtK2 cells. MAPK activation with 1h anisomycin 1.2 μ M was combined with 3h treatments using inhibitors that specifically inhibit ERK (UO126 10 μ M), p38 (SB203580 10 μ M) and JNK (SP600125 20 μ M). (n = 2)

Figure S2 (related to Figure 2A). Pull down of tubulin after an *in vitro* kinase assay. Cell lysates from non-transfected HeLa cells (NT) or from cells transfected with GFP-H1^{S147A-S312A} were used respectively as negative control and as a source of H1 for T25 phosphorylation *in vitro*, using low JNK in the presence of tubulin (2:1). After cellular extracts incubation with GFP-Trap® beads, and kinase assay with recombinant active JNK as indicated and tubulin, the beads were centrifuged. The pellet and the supernatant (SN) were analyzed by Western-blot (10% acrylamide) and probed with anti-CLIP-170 N-terminal region and anti-tubulin antibodies. (n = 1)

Figure S3 (related to Figure 2A). *In vitro* kinase assay using mouse recombinant GST-JNK1 α 1 (high and low activities) and mutated GFP-H1 purified from HeLa cells by GFP-Trap®. Porcine brain α/β tubulin in GTP- or in GDP-bound form was added or not at a 2:1 or at a 1:1 ratio relative to the maximum amount of GFP-H1 that could bind to the beads. The phosphorylation of T25 (at low JNK) and that of S147 (at high JNK) were analyzed using Phos-Tag™ gel retardation assays followed by Western-blots probed with anti-CLIP-170 N-terminal domain. Tubulin added to the assay was revealed separately. (n = 1)

Figure S4 (related to Figure 3). PtK2 and HeLa cells were transfected with GFP-H1 mutants that allowed the selective visualization of T25 (S147A S312A), S147 (T25A S312A) or S312 (T25A S147A) phosphorylations. Cells were pre-treated for 2 h with DMSO (-) or 20 μ M SP600125 (JNK_{1/2} inhibitor), then by additional 1 h co-treatment with 1.2 μ M anisomycin. Phos-Tag™ gel retardation assays and consecutive Western-blots probed with anti-CLIP-170 N-terminal domain are shown, with the expected phosphorylated (T25-P, S147-P or S312-P) and non-phosphorylated (o) forms, as well as the percentage of phospho-GFP-H1 to total GFP-H1 (P%). The data shown in the histograms are the mean \pm SD of 3 independent experiments for PtK2 cells (2 for HeLa).

Figure S5 (related to Figure 3A). Diamond graphs showing the 4 main parameters of dynamic instability obtained in PtK2 cells stably expressing GFP- α -tubulin that over-expressed single mutants of full-size CLIP-170 (T25, T45, S147 A or E). Growth speeds (G), shrinking speeds (S) and the time frequencies of catastrophes (C) and of rescues (R) were normalized relative to the WT protein. The numbers of MTs and of cells that were analyzed are indicated in each table.

Figure S6 (related to Figure 3B). The temporal rescue events measured in Figure 3B were split into 3 classes, depending on the MT destiny after the interruption of shortening phases. The 3 classes correspond respectively to rescue events in which MTs switched from shrinking to growth without (**S6**) or with an intermediate pause (**S6'**), and to events in which MT disassembly was only transiently interrupted (**S6''**).

References:

Akhmanova A, Hoogenraad CC, Drabek K, Stepanova T, Dortland B, Verkerk T, Vermeulen W, Burgering BM, De Zeeuw CI, Grosveld F, Galjart N (2001). Clasps are CLIP-115 and -170 associating proteins involved in the regional regulation of microtubule dynamics in motile fibroblasts. *Cell*. 104:923–35.

Akhmanova A and Steinmetz MO (2015). Control of microtubule organization and dynamics: two ends in the limelight. *Nat. Rev. Mol. Cell Biol.* 16:711-26.

Al-Bassam J, Kim H, Brouhard G, van Oijen A, Harrison SC, Chang F (2010). CLASP Promotes Microtubule Rescue by Recruiting Tubulin Dimers to the Microtubule. *Dev Cell*. 19:245–58.

Amin MA, Itoh G, Iemura K, Ikeda M, Tanaka K (2014). CLIP-170 recruits PLK1 to kinetochores during early mitosis for chromosome alignment. *J. Cell Sci.* 127:2818-24.

Arnal I, Heichette C, Diamantopoulos GS, Chrétien D (2004). CLIP-170/tubulin-curved oligomers coassemble at microtubule ends and promote rescues. *Curr Biol.* 14:2086–95.

Aumeier C, Schaedel L, Gaillard J, John K, Blanchoin L, Thery M (2016). Self-repair promotes microtubule rescue. *Nat Cell Biol.* 18:1054–64.

Bieling P, Kandels-Lewis S, Telley IA, van Dijk J, Janke C, Surrey T (2008). CLIP-170 tracks growing microtubule ends by dynamically recognizing composite EB1/tubulin-binding sites. *J. Cell Biol.* 183:1223–33.

Choi JH, Bertram PG, Drenan R, Carvalho J, Zhou HH, Zheng XFS (2002). The FKBP12-rapamycin-associated protein (FRAP) is a CLIP-170 kinase. *EMBO Rep.* 3:988-994.

Collazos A, Michael N, Whelan RD, Kelly G, Mellor H, Pang LC, Totty N, Parker PJ, (2011). Site recognition and substrate screens for PKN family proteins. *Biochem. J.* 438:535-43.

Coquelle FM, Caspi M, Cordelières FP, Dompierre JP, Dujardin DL, Koifman C, Martin P, Hoogenraad CC, Akhmanova A, Galjart N, De May JR, Reiner O (2002). LIS1, CLIP-170's key to the dynein/dynactin pathway. *Mol. Cell Biol.* 22:3089-102.

Daire V, Giustiniani J, Leroy-Gori I, Quesnoit M, Drevensek S, Dimitrov A, Perez F, Poüs C (2009). Kinesin-1 regulates microtubules dynamics via a c-Jun N-terminal kinase-dependent mechanism. *J. Biol. Chem.* 13:1992-2001.

Davis RJ (2000). Signal transduction by the JNK group of MAP kinases. *Cell* 103:239-252.

De Forges H, Pilon A, Cantaloube I, Pallandre A, Haghiri-Gosnet A-M, Perez F, Poüs C (2016). Localized Mechanical Stress Promotes Microtubule Rescue. *Curr. Biol.* 26:3399–406.

Dhamodharan R, and Wadsworth P (1995). Modulation of microtubule dynamic instability in vivo by brain microtubule associated proteins. *J. of Cell Sci.* 108:1679-1689.

Diamantopoulos GS, Perez F, Goodson HV, Batelier G, Melki R, Kreis TE, Rickard JE (1999). Dynamic localization of CLIP-170 to microtubule plus ends is coupled to microtubule assembly. *J. Cell Biol.* 144:99–112.

Dimitrov A, Quesnoit M, Moutel S, Cantaloube I, Poüs C, Perez F (2008). Detection of GTP-tubulin conformation in vivo reveals a role for GTP remnants in microtubule rescues. *Science.* 322:1353–6.

Dixit R, Barnett B, Lazarus JE, Tokito M, Goldman YE, Holzbaur EL (2009). Microtubule plus-end tracking by CLIP-170 requires EB1. *Proc Natl Acad Sci USA.* 106:492–7.

Ferreira JG, Pereira AL, Maiato H (2014). Microtubule plus-end tracking proteins and their roles in cell division. *Int. Rev. Cell Mol. Biol.* 309:59-140.

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.

Henty-Ridilla JL, Rankova A, Eskin JA, Kenny K, Goode BL. (2016). Accelerated actin filament polymerization from microtubule plus ends. *Science.* 352:1004-9.

- Huang C, Rajfur Z, Borchers C, Schaller MD, Jacobson K (2003). JNK phosphorylates paxillin and regulates cell migration. *Nature*. 424:219-23.
- Kakeno M, Matsuzawa K, Matsui T, Akita H, Sugiyama I, Ishidate F, Nakano A, Takashima S, Goto H, Inagaki M, Kaibuchi K, Watanabe T (2014). Plk1 phosphorylates CLIP-170 and regulates its binding to microtubules for chromosome alignment. *Cell Struct Funct*. 39:45–59.
- Kedashiro S, Pastuhov SI, Nishioka T, Watanabe T, Kaibuchi K, Matsumoto K (2015). LRRK1-phosphorylated CLIP-170 regulates EGFR trafficking by recruiting p150Glued to microtubule plus ends. *J Cell Sci*. 128:385–96.
- Komarova YA, Akhmanova AS, Kojima S-I, Galjart N, Borisov GG (2002). Cytoplasmic linker proteins promote microtubule rescue in vivo. *J. Cell Biol*. 159:589-599.
- Lacroix B, Bourdages KG, Dorn JF, Ihara S, Sherwood DR, Maddox PS, Maddox AS. (2014). In situ imaging in *C. elegans* reveals developmental regulation of microtubule dynamics. *Dev Cell*. 29:203-16.
- Lansbergen G, Komarova Y, Modesti M, Wyman C, Hoogenraad CC, Goodson HV, Lemaitre RP, Drechsel DN, van Munster E, Gadella Jr TW, Grosveld F, Galjart N, Borisov GG, Akhmanova A (2004). Conformational changes in CLIP-170 regulate its binding to microtubules and dynactin localization. *J. Cell Biol*. 166:1003-1014.
- Lee H-S, Komarova YA, Nadezhdina ES, Anjum R, Peloquin JG, Schober JM, Danciu O, van Haren J, Galjart N, Gygi SP, Akhmanova A, Borisov G (2010). Phosphorylation controls autoinhibition of cytoplasmic linker protein-170. *Mol. Biol. Cell* 21:2661-2673.
- Lei K, Nimnual A, Zong WX, Kennedy NJ, Flavell RA, Thompson CB, Bar-Sagi D, Davis RJ (2002). The Bax subfamily of Bcl2-related proteins is essential for apoptotic signal transduction by c-Jun NH(2)-terminal kinase. *Mol. Cell Biol*. 22:4929-42.
- Li H, Liu XS, Yang X, Wang Y, Wang Y, Turner JR and Liu X (2010). Phosphorylation of CLIP-170 by Plk1 and CK2 promotes timely formation of kinetochore-microtubule attachments. *The EMBO J*. 29:2953-2965.
- Hotamisligil GS and Davis RJ (2016). Cell signaling and stress responses. *Cold. Spring Harb. Perspect. Biol*. 8:1-20.
- Maki T, Grimaldi AD, Fuchigami S, Kaverina I, Hayashi I (2015). CLASP2 has two distinct TOG domains that contribute differently to microtubule dynamics. *J. Mol. Biol*. 427:2379–95.
- Mimori-Kiyosue Y, Grigoriev I, Lansbergen G, Sasaki H, Matsui C, Severin F, Galjart N, Grosveld F, Vorobjev I, Tsukita S, Akhmanova A (2005). CLASP1 and CLASP2 bind to EB1 and regulate microtubule plus-end dynamics at the cell cortex. *J. Cell Biol*. 168:141–53.

- Mishima M, Maesaki R, Kasa M, Watanabe T, Fukata M, Kaibuchi K, Hakoshima T (2007). Structural basis for tubulin recognition by cytoplasmic linker protein 170 and its autoinhibition. *Proc Natl Acad Sci USA*. 104:10346–51.
- Mitchison T, and Kirschner M (1984). Dynamic instability of microtubule growth. *Nature*. 312:237-242.
- Nakamura S, Grigoriev I, Nogi T, Hamaji T, Cassimeris L, Mimori-Kiyosue Y (2012). Dissecting the nanoscale distributions and functions of microtubule-end-binding proteins EB1 and ch-TOG interphase HeLa cells. *PLoS One*. 7:e51442.
- Nakano A, Kato H, Watanabe T, Min KD, Yamazaki S, Asano Y et al. (2010). AMPK controls the speed of microtubule polymerization and directional cell migration through CLIP-170 phosphorylation. *Nat. Cell Biol*. 12 :583-590.
- Nirschl JJ, Magiera MM, Lazarus JE, Janke C, Holzbaur ELF (2016). Alpha-Tubulin Tyrosination and CLIP-170 Phosphorylation Regulate the Initiation of Dynein-Driven Transport in Neurons. *Cell Reports*. 14:2637–52.
- Perez F, Diamantopoulos GS, Stalder R, Kreis TE (1999). CLIP-170 highlights growing microtubule ends in vivo. *Cell* 96:517-527.
- Peris L, Thery M, Fauré J, Saoudi Y, Lafanechère L, Chilton JK, Gordon-Weeks P, Galjart N, Bornens M, Wordeman L, Wehland J, Andrieux A, Job D (2006). Tubulin tyrosination is a major factor affecting the recruitment of CAP-Gly proteins at microtubule plus ends. *J. Cell Biol*. 174:839–49.
- Pierre P, Scheel J, Rickard JE and Kreis TE (1992). CLIP-170 links endocytic vesicles to microtubules. *Cell*. 70:887-900.
- Raingeaud J, Gupta S, Rogers JS, Dickens M, Han J, Ulevitch RJ, Davis RJ (1995). Pro-inflammatory cytokines and environmental stress cause p38 mitogen-activated protein kinase activation by dual phosphorylation on tyrosine and threonine. *J. Biol. Chem*. 270:7420-6.
- Rickard JE, Kreis TE (1991). Binding of pp170 to microtubules is regulated by phosphorylations. *J. Biol. Chem*. 266:17597-17605.
- Udy DB, Voorhies M, Chan PP, Lowe TM, Dumont S (2015). Draft De Novo Transcriptome of the Rat Kangaroo *Potorous tridactylus* as a Tool for Cell Biology. *PLoS One*. 10:e0134738.
- van der Vaart B, Manatschal C, Grigoriev I, Olieric V, Gouveia SM, Bjelic S, Demers J, Vorobjev I, Hoogenraad CC, Steinmetz MO, Akhmanova A (2011). SLAIN2 links microtubule plus end-tracking proteins and controls microtubule growth in interphase. *J Cell Biol*. 193:1083–99.

Verhey KJ, Meyer D, Deehan R, Blenis J, Schnapp BJ, Rapoport TA, Margolis B (2001). Cargo of kinesin identified as JIP scaffolding proteins and associated signaling molecules. *J Cell Biol.* 52:959–70.

Weisbrich A, Honnappa S, Jaussi R, Okhrimenko O, Frey D, Jelesarov I, Akhmanova A, Steinmetz MO (2007). Structure-function relationship of CAP-Gly domains. *Nat Struct Mol Biol.* 14:959–67.

Yang X, Li H, Liu XS, Deng A, Liu X (2009). Cdc2-mediated phosphorylation of CLIP-170 is essential for its inhibition of centrosome reduplication. *J. Biol. Chem.* 284:28775-28782.

Zeke A, Misheva M, Reményi A, Bogoyevitch MA (2016). JNK Signaling: Regulation and Functions Based on Complex Protein-Protein Partnerships. *Microbiol Mol Biol Rev.* 80:793–835.

Zhang Y, Liu G, Dong Z (2001). MSK1 and JNKs mediate phosphorylation of STAT3 in UVA-irradiated mouse epidermal JB6 cells. *J. Biol. Chem.* 276:42534-42.

Figure 3

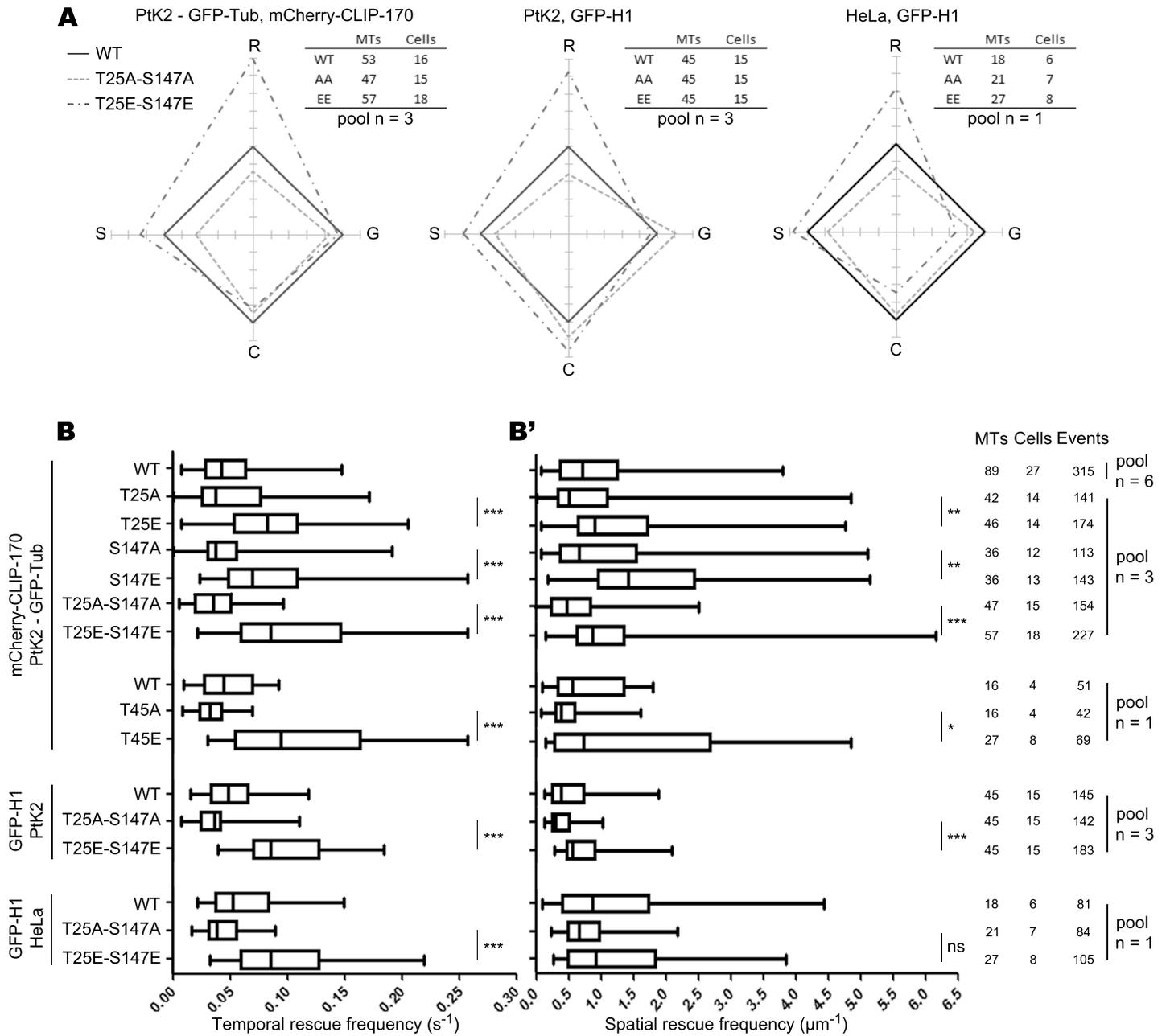
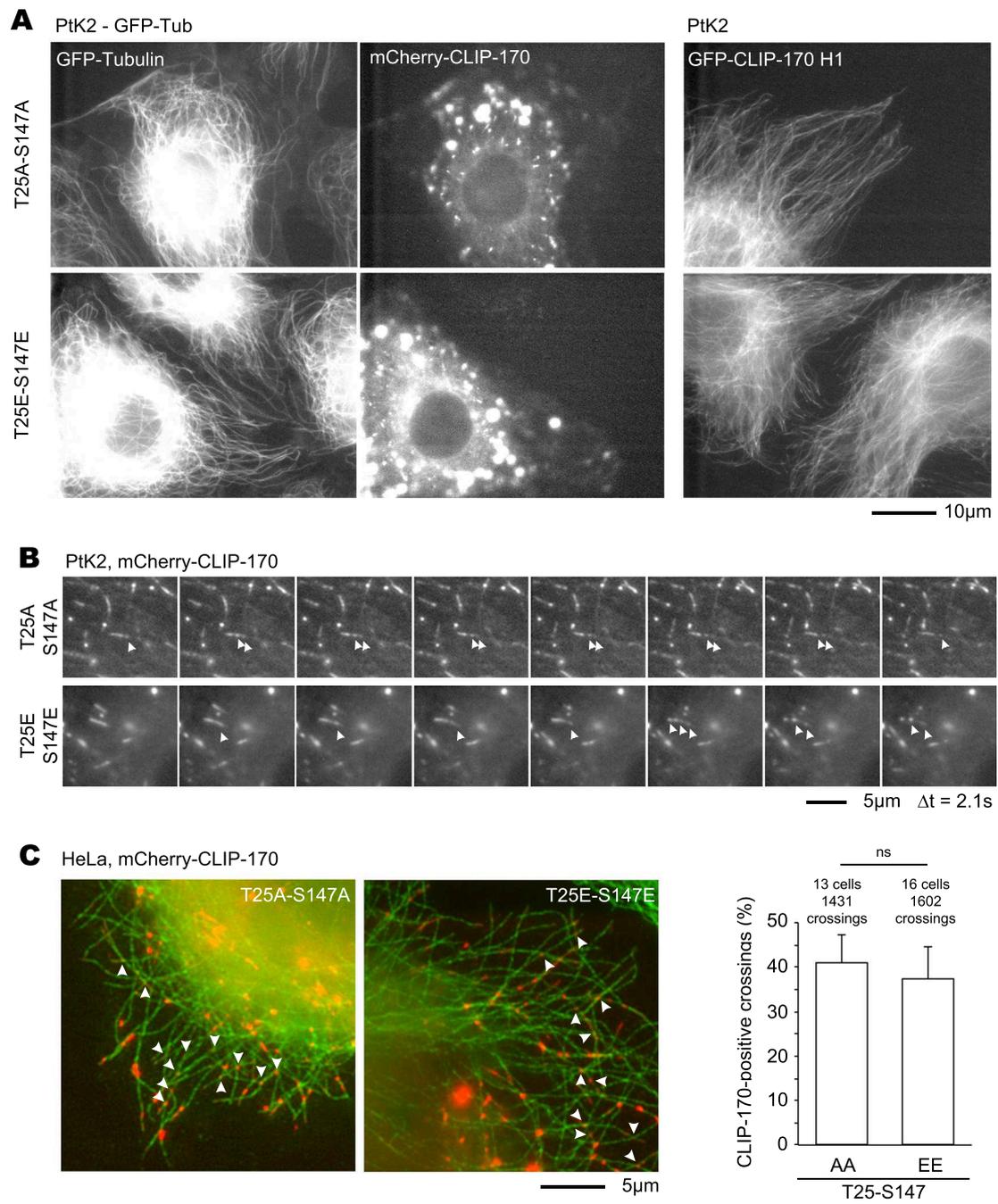
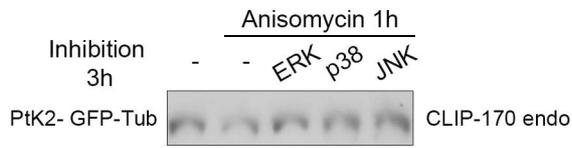


Figure 4

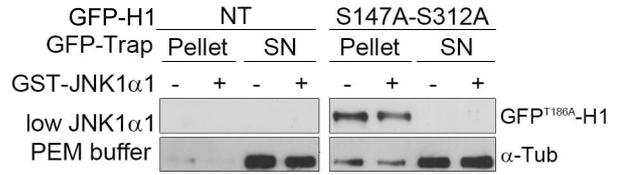


Supplemental data

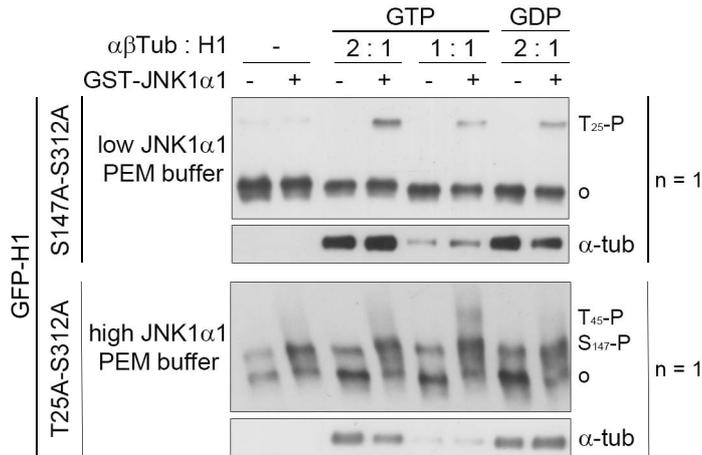
S1



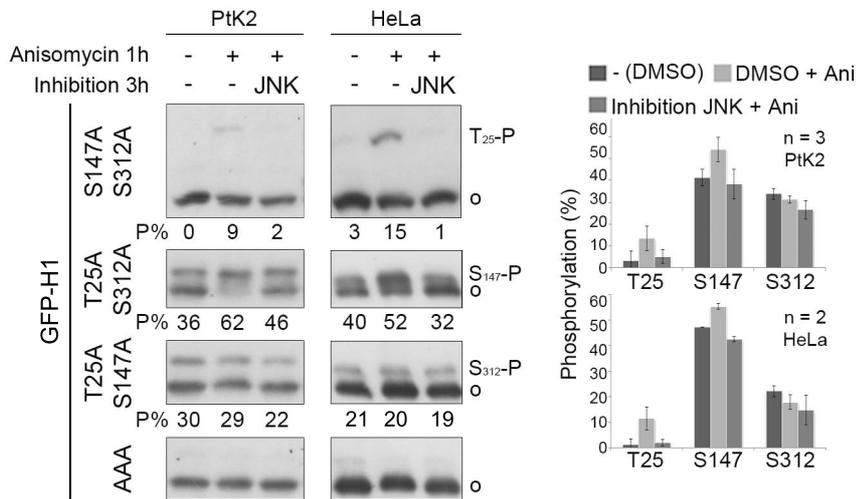
S2



S3

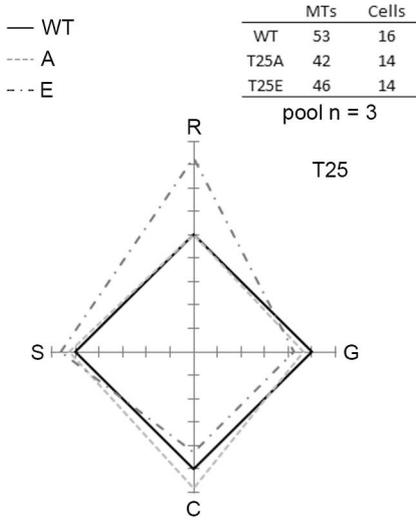


S4

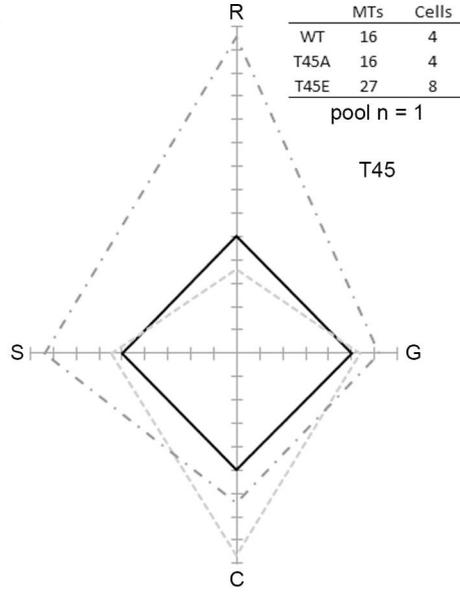


Supplemental data

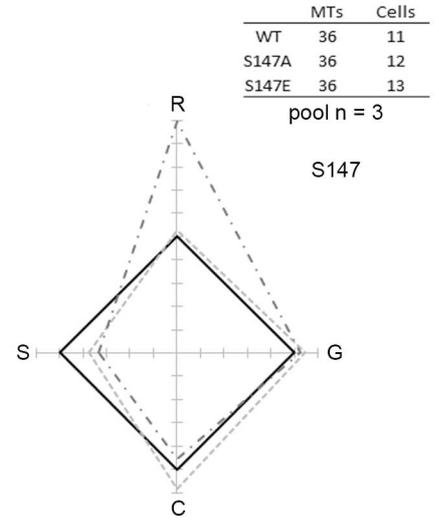
S5 PtK2 - GFP-Tub, mCherry-CLIP-170



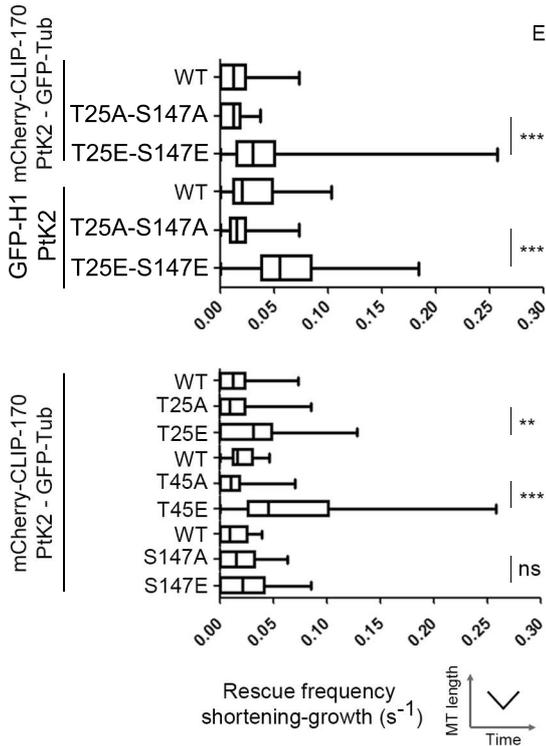
PtK2 - GFP-Tub, mCherry-CLIP-170



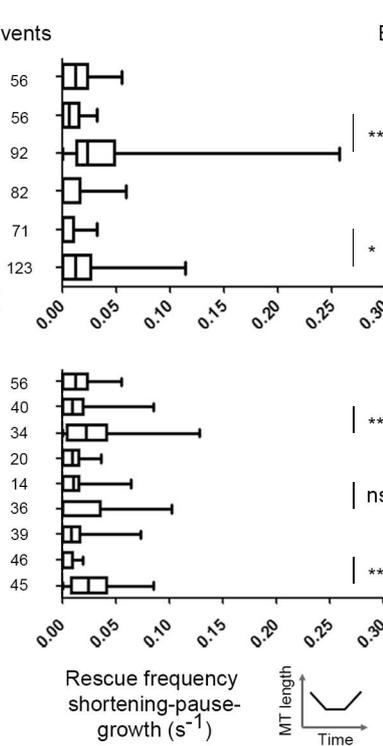
PtK2 - GFP-Tub, mCherry-CLIP-170



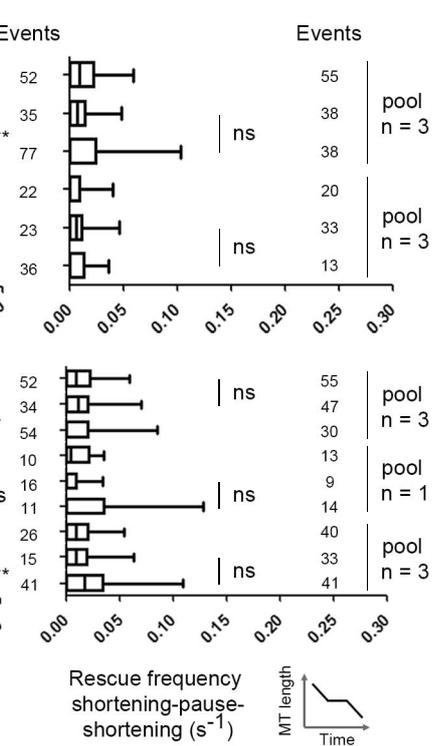
S6



S6'



S6''



Résultats complémentaires concernant CLIP-170

Nous avons montré (cf. **Figure 1 de l'article**) que le transgène GFP-H1, contenant le domaine N-terminal du facteur de sauvetage des MTs CLIP-170 (H1) est phosphorylé par JNK en condition de stress, sur trois sites consensus SP/TP indépendants (Thr25, Thr45 et Ser147). La Ser147 est phosphorylée avec un taux basal de 40% dans les cellules HeLa non stressées, un taux de 50-65% suite à un stress court (anisomycine 1,2 μ M 1h, NaCl 350 mM 1h, UVC 200J/m² 10 min) et un taux de 60-75% suite à un stress long (Flag-MKK7-JNK^{WT} 24h, isoformes JNK1 α 1 ou JNK2 α 2). La Thr25 est phosphorylée avec un taux de 15-25% suite à un stress court et un taux de 60-70% suite à un stress long. Enfin, la Thr45 est phosphorylée uniquement en condition de stress long, avec un taux de 25-35%. Par ailleurs, le domaine N-terminal de CLIP-170 est aussi phosphorylé sur la Ser312 de façon basale (taux de 25%) et ce de façon indépendante de JNK. En effet, ce site est un substrat connu d'autres kinases, telles que l'AMPK et la PKA. Ces phosphorylations sont probablement conservées sur la protéine CLIP-170 endogène, mais la taille de la protéine ne nous a pas permis de le montrer de façon précise sur gel SDS-PAGE.

Nous avons montré qu'*in vitro*, nos trois sites sont phosphorylés directement par GST-JNK1 α 1 recombinante (cf. **Figure 2 de l'article**). Quand l'activité de la JNK est forte, ces phosphorylations ne nécessitent pas la présence de dimère α/β -tubuline, (Thr25, Thr45 et Ser147 phosphorylées respectivement à 100%, 50% et 70% environ). Par contre, quand l'activité de JNK est plus limitante, la présence de dimères de tubuline (associés au GDP ou GTP) permet la phosphorylation de la Thr25 (10% environ) sans permettre la phosphorylation des Thr45 et Ser147.

En accord avec l'effet activateur de JNK sur les fréquences de sauvetage des MTs, nous avons montré que des mutations phospho-mimétiques (T25E, T45E et S147E) augmentent significativement l'activité de transgènes CLIP-170-H1 et CLIP-170-entier dans des cellules épithéliales humaines HeLa ou de rat-kangourou PtK2 (cf. **Figure 3 de l'article**). La Thr45 a un effet plus important sur les fréquences de sauvetage que la Thr25 ou la Ser147 et augmente aussi la vitesse de dépolymérisation des MTs. Plus précisément, alors que la Thr45 semble plutôt favoriser les événements de re-polymérisation après une pause, la Thr25 stimule ces deux événements de façon équivalente.

Dans l'optique de mieux comprendre le mécanisme d'action de ces trois phosphorylations sur l'activité du facteur de sauvetage CLIP-170, nous avons montré qu'elles n'affectent pas son recrutement sur les MTs, au niveau des comètes ou des sites potentiels de sauvetage (cf. **Figure 4 de l'article**). Par ailleurs, comme déjà montré avec des activateurs ou inhibiteurs de JNK, le niveau de phosphorylation de transgènes CLIP-170-H1 ou entier altèrent les fréquences de sauvetage sans pour autant affecter le réseau de MTs cellulaire.

I – Phosphorylation de CLIP-170 endogène

Nous avons vérifié si les stress NaCl et UVC avaient le même effet que l'anisomycine sur la protéine CLIP-170 endogène dans les cellules HeLa et s'ils étaient spécifiques de JNK. Comme contrôle nous avons aussi testé l'effet des inhibiteurs des MAPKs sur la phosphorylation basale de CLIP-170, ainsi que l'effet de la construction constitutivement active de JNK (Flag-MKK7-JNK1 α 1^{WT}) ou la construction inactive (Flag-MKK7-JNK1 α 1^{apf}) correspondante (cf. Figure 146).

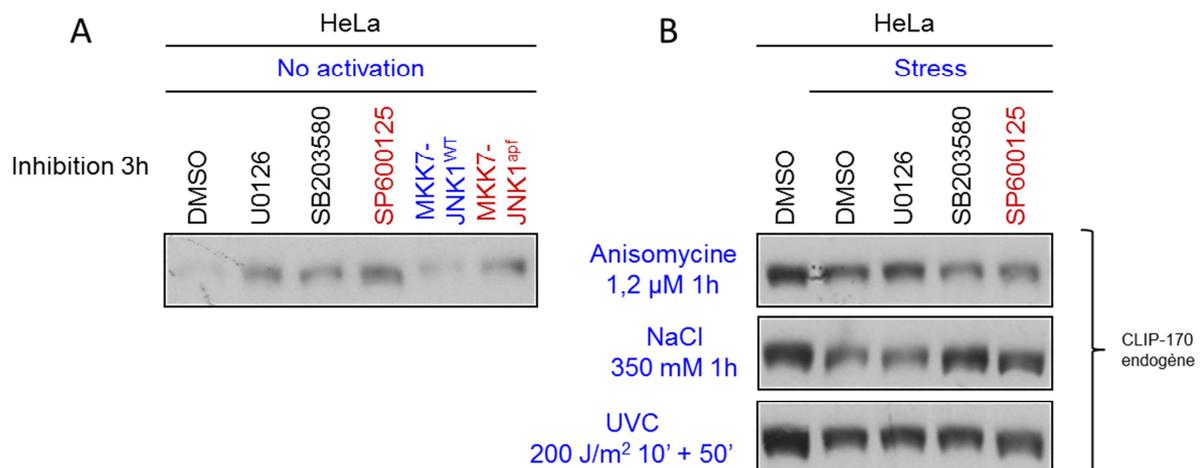


Figure 146 : Étude de la phosphorylation de CLIP-170 endogène. Western-blots (gels 6 % acrylamide, migrés 2h) de CLIP-170, d'extraits cellulaires de cellules HeLa traitées avec des inhibiteurs des MAPKs : UO126 pour ERK1/2 (10 μ M 3h), SB203580 pour p38 α / β (10 μ M 3h) et SP600125 pour JNK (20 μ M 3h), ou DMSO (0,1% 3h), pour certaines conditions sous l'activation de la voie des MAPKs pendant la dernière heure via l'anisomycine (1,2 μ M), le NaCl (350 mM), ou les UVC (10 min d'irradiation à 200 J/m², puis 50 min d'incubation). Afin d'activer JNK, les cellules HeLa sont transfectées pendant 24h avec la construction constitutivement active de JNK1 α 1 (Flag-MKK7-JNK1^{WT}) ou contrôle inactif (Flag-MKK7-JNK1^{apf}). Les Western-blots sont hybridés avec l'anticorps anti-CLIP-170 N-terminal #16234 (n = 1).

Sur les Western-blots ci-dessus, nous observons qu'un léger délai de migration est induit par les activateurs de JNK (NaCl et UVC par rapport au DMSO) et que cet effet est annulé par l'inhibiteur spécifique de JNK (cf. Figure 146), comme montré précédemment avec l'anisomycine (cf. Figure 146-B). Cela suggère que la protéine endogène est déjà partiellement phosphorylée dans les cellules HeLa et que le stress augmente modestement cette phosphorylation. Un retard de migration modéré est aussi obtenu avec la construction constitutivement active de JNK (Flag-MKK7-JNK1 α 1^{WT}) (cf. Figure 146-A), alors que l'inhibiteur (SP600125) accélère un peu la migration, confirmant que la protéine CLIP-170 endogène dans les cellules HeLa est probablement phosphorylée de façon basale et que sous stress, JNK augmente cette phosphorylation. Des anticorps spécifiques de chaque phosphorylation (Thr25, Thr45 et Ser147) seront indispensables pour déterminer quels acides aminés de CLIP-170 sont réellement phosphorylés de façon basale et quantifier les niveaux

spécifiques de phosphorylation atteints sous stress. Ces anticorps permettront également de rechercher des dérégulations des phosphorylations de CLIP-170 dans des pathologies humaines.

II – Phosphorylation *in vitro* du domaine H1 de CLIP-170 par JNK

Les expériences de phosphorylation *in vitro* de CLIP-170 par JNK nous ont permis de montrer que la kinase, quand elle est complètement fonctionnelle phosphoryle directement la Thr25, Thr45, la Ser147 et un site non identifié X (cf. **Figure 2B de l'article**). On notera qu'un site non caractérisé est aussi phosphorylé dans les cellules HeLa en condition de stress 24h (cf. **Figure 1D de l'article**), suggérant que le site X visualisé *in vitro* n'est probablement pas un artefact.

A – Impact de l'activité de JNK sur la phosphorylation du domaine H1 de CLIP-170 *in vitro*

Nous avons vu précédemment que seule la Thr25 est phosphorylée avec une JNK peu active (cf. **Figure 2A de l'article**). Pour vérifier que les Thr45, Ser147 et X ne sont pas phosphorylés dans ces conditions limitantes, nous avons utilisé des transgènes triple mutés en alanine, pour voir chacun de ces sites spécifiquement.

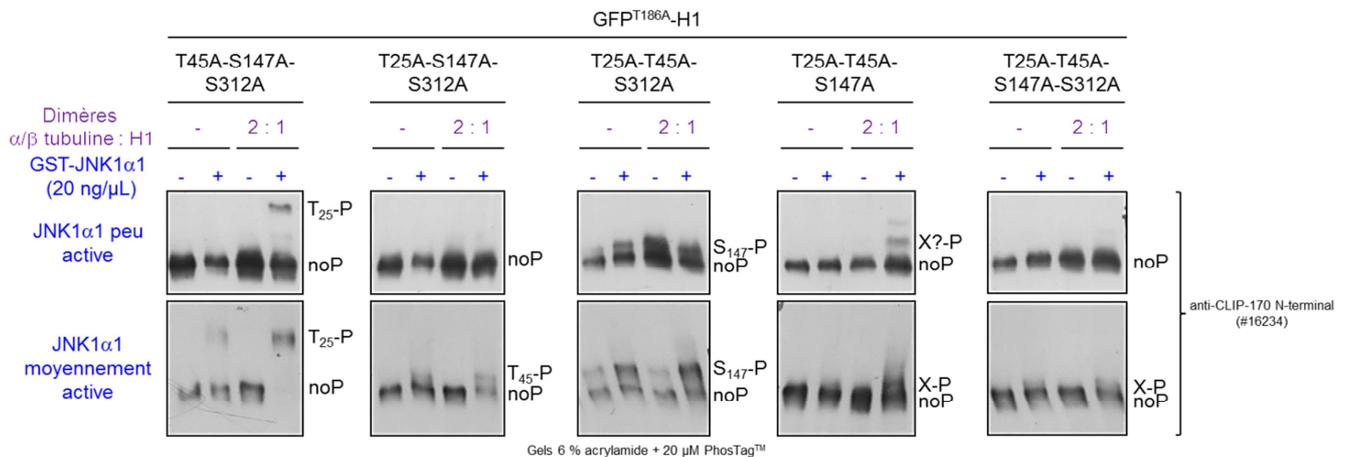


Figure 147 : Observation de l'impact de l'activité de JNK1α1 sur la phosphorylation du domaine H1 de CLIP-170 dans le système reconstitué *in vitro*. Western-blots (gels 6 % acrylamide + 20 μM PhosTag™) sur des échantillons de phosphorylation *in vitro* par une kinase recombinante (GST-JNK1α1 peu et moyennement active) de la Thr25 (construction GFP^{T186A}-H1^{T45A-S147A-S312A}), la Thr45 (GFP^{T186A}-H1^{T25A-S147A-S312A}), la Ser147 (GFP^{T186A}-H1^{T25A-T45A-S312A}) et la Ser312 (GFP^{T186A}-H1^{T25A-T45A-S147A}). Les Western-blots sont hybridés avec l'anticorps anti-CLIP-170 N-terminal #16234 (n = 1).

Sur les Western-blots ci-dessus (cf. **Figure 147**), nous observons qu'en présence d'une JNK1α1 recombinante peu active, seule la Thr25 est bien phosphorylée et que cette

phosphorylation est augmentée quand de la tubuline est ajoutée dans le mélange réactionnel. Ce résultat confirme que les Thr25, Ser147 et X ne sont pas phosphorylées par une JNK peu active. Concernant la Ser312, nous visualisons une bande supplémentaire en présence de JNK1 α 1 et de tubuline. Cependant, cette dernière ne correspond probablement pas à la phosphorylation de la Ser312 car nous avons vu précédemment que ce site est indépendant de l'activité de JNK aussi bien dans les cellules qu'*in vitro*. Lorsque qu'une kinase moyennement active est utilisée, nous observons qu'en absence de tubuline, la Thr25, la Thr45, la Ser147 et X sont phosphorylées par JNK et que leur phosphorylation est un peu facilitée en présence de tubuline. Quant à la Ser312, elle ne semble pas phosphorylée car son profil de phosphorylation est assez similaire à celui où elle est mutée.

L'ensemble de ces données, nous permet de compléter les résultats précédemment décrits et de conclure qu'*in vitro* seule la Thr25 est phosphorylée avec une kinase recombinante peu active. En revanche, lorsque qu'une kinase moyennement ou très active est utilisée, la phosphorylation des Thr25, Thr45, Ser147 et X est augmentée, indiquant que ces sites sont directement phosphorylés par JNK. Ces résidus sont tous sensibles à l'addition de tubuline dans le mélange réactionnel, qui aide la kinase recombinante à les phosphoryler. Concernant la Ser312, en accord avec ce que nous avons vu préalablement, nous concluons que ce site n'est pas phosphorylé *in vitro*.

B – Impact de l'état de la tubuline (monomère, dimère ou polymère) lors des essais de phosphorylation *in vitro*

Précédemment, nous avons vu que l'addition de dimères α/β -tubuline (avec ou sans du GTP) dans le système de phosphorylation *in vitro* aide JNK à phosphoryler le domaine H1 de CLIP-170 (cf. **Figure S3 de l'article**). En lien avec ces données, nous avons voulu savoir si la phosphorylation de la Thr25 et la Ser147 sont changées avec l'utilisation de polymères ou monomères de tubuline au lieu du mélange de dimères classiquement utilisé jusqu'à présent. Pour cela, en parallèle de la tubuline (37 μ M) nous avons ajouté du nocodazole ou du taxol® dans le mélange réactionnel avant de mettre la JNK recombinante. L'ajout du nocodazole (33 μ M) permet d'obtenir des monomères de tubuline, alors que le taxol® induit l'assemblage de la tubuline soluble. La concentration de taxol® (33 μ M) utilisée est supposée permettre déplacer fortement l'équilibre vers le polymère. De plus, afin d'étudier l'impact de monomères de tubuline nous avons utilisé un tampon Tris-HCl au lieu du tampon PEM, car ce tampon dissocie les dimères d' α/β -tubuline (**Giraudel *et al.*, 1998**).

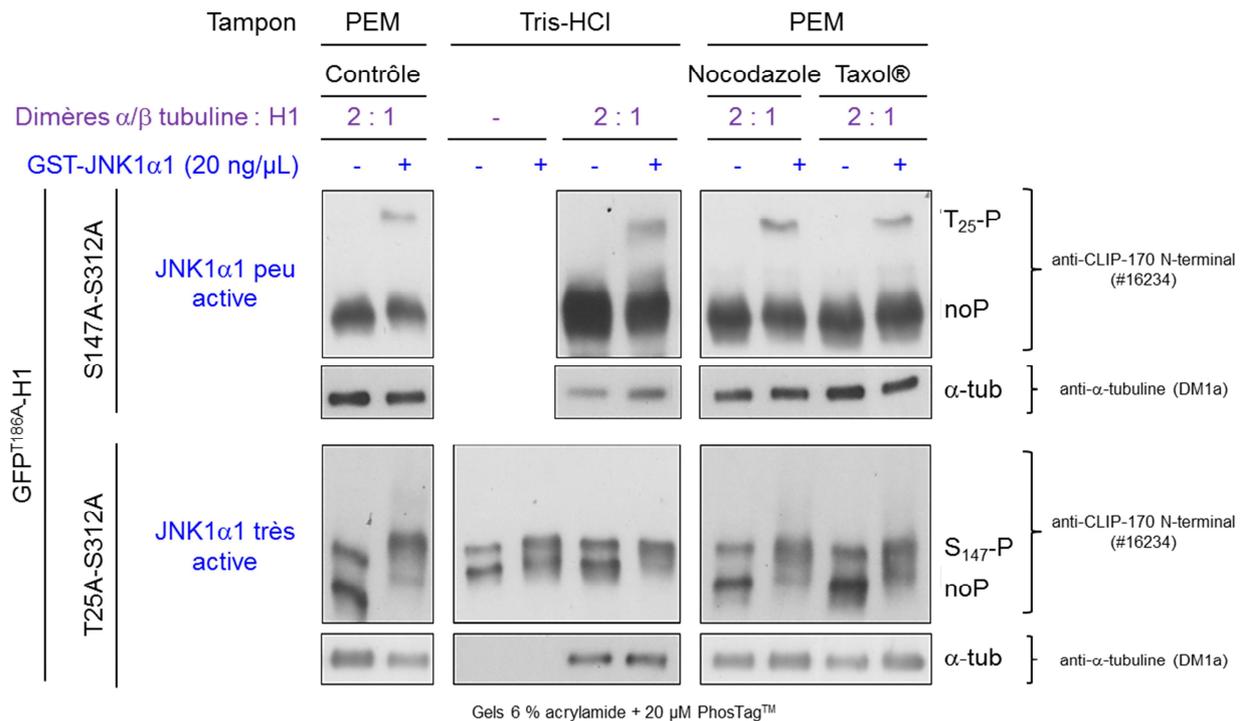


Figure 148 : Détermination de l'impact de l'état de la tubuline (monomère, dimère ou polymère) lors de la phosphorylation *in vitro* de CLIP-170 par JNK1α1 (GST-JNK1α1 plus ou moins active). Western-blots (gels 6 % acrylamide + 20 μM PhosTag™) sur les échantillons de phosphorylation de la Thr25 (construction GFP^{T186A}-H1^{S147A-S312A}) et la Ser147 (construction GFP^{T186A}-H1^{T25A-S312A}) dans le domaine H1 de CLIP-170. La quantité de dimères de tubuline ajoutée est montrée pour chaque condition. En tampon Tris on a des monomères de tubuline, en PEM nocodazole des dimères et en PEM taxol® des polymères. Les Western-blots sont révélés avec les anticorps anti-CLIP-170 N-terminal #16234 et anti-α-tubuline DM1A (n = 1).

L'analyse des échantillons en Western-blot (cf. **Figure 148**) permet de montrer que l'état de l'α/β-tubuline (monomère, dimère ou polymère), ne semble pas avoir d'impact sur l'efficacité de phosphorylation de la Thr25 ou la Ser147 par JNK. En effet, l'intensité des bandes correspondantes à la Thr25 phosphorylée (T₂₅-P) ou la Ser147 phosphorylée (S₁₄₇-P) dans les Western-blots ci-dessus ne semble pas changée en fonction des conditions.

Ces données préliminaires sont intéressantes car elles suggèrent qu'*in vitro* la polymérisation de la tubuline ne semble pas être un facteur qui influence la phosphorylation du domaine H1 de CLIP-170 par JNK. L'extrapolation de ces données, nous permet de supposer que JNK est capable de phosphoryler aussi bien le CLIP-170 cytoplasmique liée ou non à des dimères de tubuline, que le CLIP-170 attachée aux MTs.

III – Identification des sites de phosphorylation de JNK par spectrométrie de masse

Au cours de ce travail, nous avons également entrepris une analyse des échantillons en spectrométrie de masse du domaine H1 de CLIP-170 pour identifier les sites phosphorylés par la protéine kinase JNK. Les analyses ont été menées sur deux extraits cellulaires de cellules HeLa transfectées avec la construction GFP-H1^{WT} de CLIP-170, soit traitées avec l'inhibiteur spécifique de JNK (SP600125), soit co-transfectées avec la construction constitutivement active de JNK1 α 1 (Flag-MKK7-JNK1 α 1^{WT}). Avant d'être analysés, les échantillons ont été récupérés dans un gel SDS-PAGE coloré au bleu de Coomassie et ont subi une digestion enzymatique (trypsine). Les peptides obtenus ont été séparés par chromatographie en phase liquide (LC) et ont ensuite été détectés avec un spectrophotomètre de masse en tandem (MS/MS).

Ces résultats de spectrométrie de masse sont juste informatifs et non exhaustifs, car l'ensemble des peptides analysés ne recouvrent pas complètement la séquence peptidique de GFP-H1 (cf. **Figure 149**). Effectivement, plusieurs sérines, thréonines et tyrosines (en rose) n'ont pas été analysées du fait qu'elles n'étaient pas dans les peptides détectés (soulignés), pour la condition SP600125 (cf. **Figure 149-A**) ou Flag-MKK7-JNK1 α 1^{WT} (cf. **Figure 149-B**). En ce qui concerne les sites consensus de phosphorylation de H1 pour JNK, ils sont tous retrouvés dans des peptides détectés (T25, Thr45 et Ser147 en rouge et les autres en violet).

A - SP600125, recouvrement : 61%

(20 sites dans GFP et 10 sites dans H1 non couverts)

MSKGEELFTGVVPILV~~ELDGDVNGHKFSV~~S~~SGE~~
GEGDATYGKLT~~LK~~FICT~~TTG~~KLPVPWP~~TLV~~TTF
AYGLQCFARYPDHMKQHDF~~FKSAM~~PEGYVQER
TIFFKDDGNYKTRAEV~~KFEGD~~TLVNRIELKGI
DFKEDGNILGHKLEYN~~NSHSVY~~IMADKOKNG
IKVNFKIRHNIEDG~~SVQLADHYQON~~TPIGDGP
VLLPDNHYLS~~TQSALS~~KDPNERRD~~HMVLL~~EFV
TAAGITHGMD~~ELYKPR~~PANLNIM~~SMLKPS~~GLK
APTKILKPGSTALK~~TP~~TAVVAPVEK~~TISSE~~KA
SSTPSSETOEEFVDDFRVGERV~~VWNGNK~~PGFI
QFLGETQFAPGQWAGI~~VLDEPI~~GKNDG~~SVAGV~~
RYFOCEPLKGI~~FTRPS~~KL~~TRK~~VOAEDEANGLO
TTPASRAT~~SP~~LCTSTAS~~MVSS~~SP~~STPS~~NIPOK
PSQPAAKEPSA~~TP~~PISNLTKTASESISNLSEA
GSIKKGERELKIGDRVLVGGTKAGV~~VRF~~LG~~ET~~
DFAKGEWC~~GVELDEPL~~GKNDGAVAGTRYFOCQ
PKYGLFAPVHKV~~TKIGFP~~ST~~TP~~AKAKANAVRR
VMATTSASLKR~~SP~~SASSLSSMSSVASSVSSRP
SRTGLLLTETSSRYARKIR

B – Flag-MKK7-JNK1 α 1^{WT}, recouvrement : 58%

(20 sites dans GFP et 11 sites dans H1 non couverts)

MSKGEELFTGVVPILV~~ELDGDVNGHKFSV~~S~~SGE~~ 32
GEGDATYGKLT~~LK~~FICT~~TTG~~KLPVPWP~~TLV~~TTF 64
AYGLQCFARYPDHMKQHDF~~FKSAM~~PEGYVQER 96
TIFFKDDGNYKTRAEV~~KFEGD~~TLVNRIELKGI 128
DFKEDGNILGHKLEYN~~NSHSVY~~IMADKOKNG 160
IKVNFKIRHNIEDG~~SVQLADHYQON~~TPIGDGP 192
VLLPDNHYLS~~TQSALS~~KDPNERRD~~HMVLL~~EFV 224
TAAGITHGMD~~ELYKPR~~PANLNIM~~SMLKPS~~GLK 238/10
APTKILKPGSTALK~~TP~~TAVVAPVEK~~TISSE~~KA 42
SSTPSSETOEEFVDDFRVGERV~~VWNGNK~~PGFI 74
QFLGETQFAPGQWAGI~~VLDEPI~~GKNDG~~SVAGV~~ 106
RYFOCEPLKGI~~FTRPS~~KL~~TRK~~VOAEDEANGLO 138
TTPASRAT~~SP~~LCTSTAS~~MVSS~~SP~~STPS~~NIPOK 170
PSQPAAKEPSA~~TP~~PISNLTKTASESISNLSEA 202
GSIKKGERELKIGDRVLVGGTKAGV~~VRF~~LG~~ET~~ 234
DFAKGEWC~~GVELDEPL~~GKNDGAVAGTRYFOCQ 266
PKYGLFAPVHKV~~TKIGFP~~ST~~TP~~AKAKANAVRR 298
VMATTSASLKR~~SP~~SASSLSSMSSVASSVSSRP 330
SRTGLLLTETSSRYARKIR 348

Figure 149 : Recouvrement de séquence de la protéine GFP-H1^{WT} en spectrométrie de masse (A) Dans l'échantillon SP600125 (61 %) et (B) dans l'échantillon Flag-MKK7-JNK1 α 1^{WT} (58 %). Sur les séquences, nous avons indiqué : les peptides analysés (soulignés), les sérines (S), thréonines (T) et tyrosines (Y) non recouvertes (en rose), les sites consensus de phosphorylation pour JNK (en gras-violet ou en gras-rouge pour les Thr25, Thr45 et Ser147), la séquence de l'étiquette GFP (en vert), le linker (en bleu) et la séquence du domaine H1 de CLIP-170 (en noir). Le numéro des acides aminés est indiqué à droite, en vert pour la GFP et en noir pour H1.

L'analyse des différents peptides détectés a permis d'identifier les sites de phosphorylation dans les deux échantillons. Ces derniers sont regroupés dans le tableau ci-dessous (cf. **Tableau 30**). De manière générale, lorsque JNK est inhibé (SP600125), 7,5 % des peptides de H1 ont été retrouvés phosphorylés, tandis que lorsque JNK est activé (Flag-MKK7-JNK1 α 1^{WT}), 24 % des peptides de H1 sont phosphorylés. Ainsi, globalement, l'activation de JNK induit la phosphorylation du domaine H1 de CLIP-170.

	SP600125			Flag-MKK7-JNK1α1^{WT}		
	Non phosphorylé	Phosphorylé ?	Phosphorylé	Non phosphorylé	Phosphorylé ?	Phosphorylé
T25	20	7	2	7	4	18
S44	38	1	0	23	11	1
T45	35	1	3	18	11	6
S47	38	1	0	23	10	2
S48	38	1	0	23	9	3
T50	37	1	1	24	11	0
T140	19	0	1	16	2	6
S143	20	0	0	22	1	6
S147	10	2	0	0	2	0
S160	10	2	0	0	2	0
T163	10	2	0	0	1	1
T182	14	0	3	12	0	8
S195	32	0	2	24	1	1
S200	33	0	0	24	1	1
T287	22	2	0	14	1	0
S310	17	0	0	9	1	0
S312	17	0	0	9	1	0

Tableau 30 : Bilan des sites de phosphorylation détectés par analyse nano-LC-MS/MS Triple TOF (analyse menée à la plateforme SICapS, IBBC, Gif sur Yvette). Parmi les sites détectés dans les échantillons, les sites consensus de phosphorylation pour JNK (SP/TP) sont indiqués en gras et les sites Thr25, Thr45 et Ser147 sont indiqués en rouge. Les sites de phosphorylation SP/TP identifiés comme les plus phosphorylés sous l'effet de JNK sont surlignés en jaune.

Parmi les sites de phosphorylation détectés (cf. **Tableau 30**), les Thr25 et Thr45 sont retrouvées clairement phosphorylées de manière dépendante de JNK. En effet, dans la condition Flag-MKK7-JNK1 α 1^{WT} ces sites sont retrouvés comme phosphorylés et leur phosphorylation est diminuée par le SP600125. Concernant la Ser147, lorsque JNK est inhibée (SP600125) ce site est dé-phosphorylé, indiquant que la phosphorylation de ce site dépend de l'activité de la kinase. Cependant, en condition d'activation de JNK (Flag-MKK7-JNK1 α 1^{WT}), les peptides non phosphorylés disparaissent, mais cela ne génère pas l'apparition de peptides phosphorylés. Ceci suggère que ces derniers existent peut-être, mais ne sont détectables dans l'expérience. Quant à la Ser312, similairement à nos données de phosphorylation dans les cellules et *in vitro*, cette analyse en spectrométrie de masse n'a pas permis de mettre en évidence sa phosphorylation.

En plus des Thr25, Thr45 et Ser147, d'autres sites SP/TP sont notablement phosphorylés par Flag-MKK7-JNK1 α 1^{WT}, tels que les Thr140, Thr163 et Thr182. L'un de ses sites pourrait donc correspondre au site X que nous avons mis en évidence comme substrat de

JNK *in vitro* et *in vivo* en présence d'un stress long de 24h (Flag-MKK7-JNK1 α 1^{WT}) (cf. **Figures 1 et 2 de l'article**). Pour tester cette hypothèse, il faudra entreprendre des mutagénèses dirigées dans lesquels les Thr25, Thr45, Ser147 et Ser312 seront mutées avec soit la Thr140, soit la Thr163 ou la Thr182 mutée en alanine. Cela nous permettra d'observer s'il y a disparition de la bande de phosphorylation restante avec une de ces trois constructions lors d'une activation longue de JNK.

IV – Niveau d'activation de la JNK endogène en fonction des stress

Au cours de ce travail, nous avons utilisé différents stress pour activer la protéine kinase JNK dans les cellules épithéliales (cf. **Figure 1 de l'article**). Nous avons vérifié que les stress courts (anisomycine, NaCl et UVC) activent bien de la même façon les isoformes de JNK (JNK1 α 1 et JNK2 α 2) endogènes et nous avons comparé ce niveau à d'autres stress connus pour activer JNK. Pour cela, nous avons analysé par Western-blot la double phosphorylation des JNKs endogènes, sur le site consensus T₁₈₃PY₁₈₅, traduisant l'activation de ces dernières par les kinases amont MKK4 et MKK7. Pour les stress longs de 24h, nous avons aussi vérifié que les constructions constitutivement actives (Flag-MKK7-JNK1 α 1^{WT} et Flag-MKK7-JNK2 α 2^{WT}) et inactives (Flag-MKK7-JNK1 α 1^{apf}) de JNK s'expriment dans les cellules.

Dans la littérature, les composés couramment utilisés pour stresser les cellules et activer les protéines JNKs sont : l'anisomycine, le H₂O₂, le NaCl, le TNF et les UVC. L'anisomycine est un antibiotique qui se fixe aux petites GTPases (Rac1 et Cdc42 en amont des JNKs) et qui à long terme inhibe la traduction, le H₂O₂ est une espèce réactive de l'oxygène qui induit un stress oxydant, le NaCl induit un stress osmotique, le TNF favorise l'inflammation et l'irradiation des cellules aux UVC engendre des cassures dans l'ADN. Par ailleurs, l'expression de transgènes Flag-MKK7-JNK est connue pour induire l'apoptose à long terme.

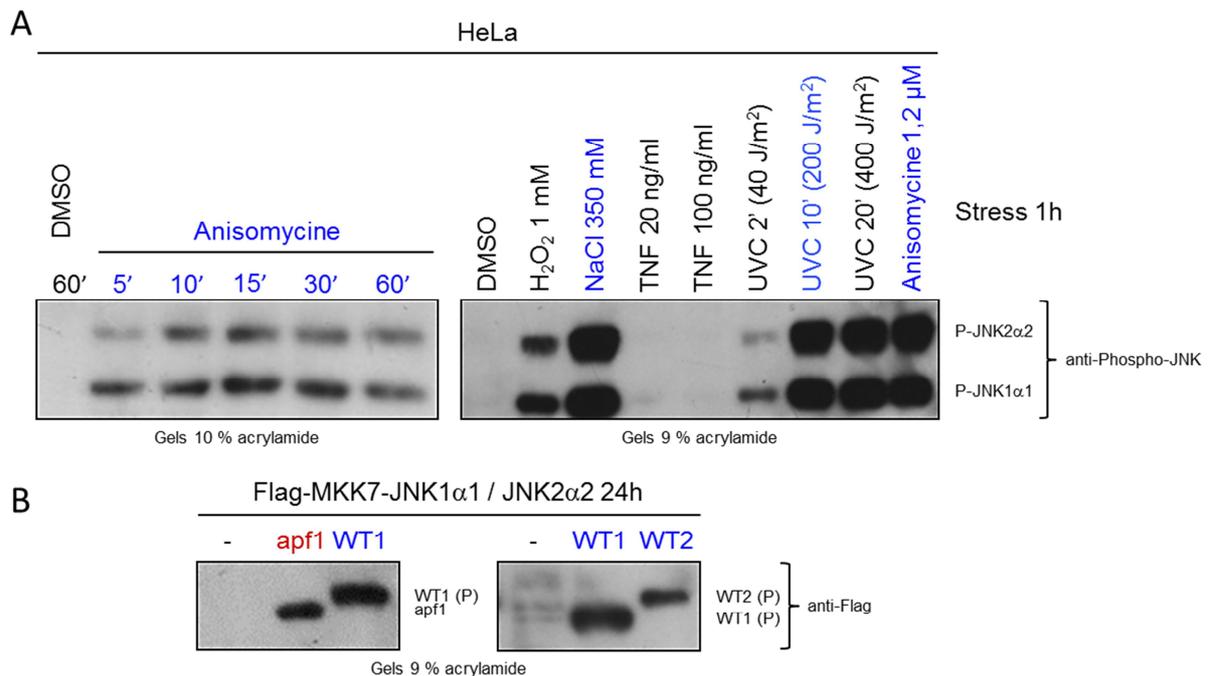


Figure 150 : Contrôle de l'activation des JNKs endogènes par des stress courts et l'expression des transgènes de Flag-MKK7-JNK après 24h de transfection. **(A)** Les cellules HeLa sont traitées par l'anisomycine (1,2 μ M) selon une cinétique (de 5 à 60 minutes) et par d'autres composés connus pour activer les JNKs pendant 1h (H_2O_2 , NaCl, TNF et UVC). Les Western-blots sont hybridés avec l'anticorps anti-phospho-JNK pour observer la double phosphorylation de JNK1 α 1 et JNK2 α 2 endogènes sur le site consensus T₁₈₃PY₁₈₅, traduisant leur activation. **(B)** Les cellules HeLa sont transfectées pendant 24h avec les constructions constitutivement actives (Flag-MKK7-JNK1 α 1^{WT}, Flag-MKK7-JNK2 α 2^{WT}) et inactive (Flag-MKK7-JNK1 α 1^{apf}), révélées par Western-blot avec un anticorps anti-Flag.

La cinétique avec l'anisomycine permet de montrer que dès 5 minutes les JNKs endogènes sont phospho-activées à un niveau important (cf. **Figure 150-A**), avec l'isoforme longue JNK2 α 2 un peu moins phosphorylée que l'isoforme courte JNK1 α 1. L'utilisation des autres stress permet de montrer que le NaCl (350 mM 1h) et les UVC (200J/m² 10 min) induisent la même phosphorylation des JNKs que l'anisomycine (cf. **Figure 150-A**). Par contre, les autres stress testés (H_2O_2 , TNF, UVC 2 min) n'induisent pas une phospho-activation des JNK endogènes suffisante pour induire la phosphorylation de CLIP-170 (données non montrées pour CLIP-170).

En ce qui concerne les transgènes Flag-MKK7-JNK, nous montrons qu'ils sont bien exprimés après 24h de transfection dans les cellules HeLa (cf. **Figure 150-B**). Comme attendu, la protéine Flag-MKK7-JNK1 α 1^{WT} migre plus haut que Flag-MKK7-JNK1 α 1^{apf} du fait de sa double phosphorylation sur le site TPY. De plus, la protéine Flag-MKK7-JNK1 α 1^{WT} migre plus vite que l'isoforme JNK2 α 2^{WT}, du fait que cette dernière possède un domaine C-terminal plus long (cf. **Figure 125**). L'expression des transgènes est réalisée pendant 24h et non 48h dans les cellules afin de ne pas trop induire de mort cellulaire. Ainsi, nous pouvons dire que les

constructions constitutivement actives et inactives des JNK s'expriment correctement dans les cellules HeLa.

L'ensemble de ces données montrent donc que les stress courts utilisés lors de cette étude (anisomycine, NaCl, UVC) phospho-activent tous fortement les isoformes de JNK endogène et que les constructions constitutivement actives et inactives Flag-MKK7-JNK s'expriment correctement dans les cellules HeLa, permettant d'induire ou pas un stress long.

V – Localisation de CLIP-170 et état du réseau de microtubules en fonction de la phosphorylation

En plus de sa localisation aux extrémités (+) des MTs (**Perez *et al.*, 1999**), CLIP-170 se localise aussi au niveau des intersections microtubulaires (**De Forges *et al.*, 2016**) qui sont des sites potentiels de sauvetage (**Dimitrov *et al.*, 2008**). Dans l'article, nous avons observé que la localisation de mutant non-phosphorylables et phospho-mimétiques de CLIP-170 exogène (T25A-S147A ou T25E-S147E) au niveau des croisements microtubulaires ne varie pas (cf. **Figure 4 de l'article**). En continuité de ces expériences, nous avons observé la localisation de CLIP-170 endogène au niveau des intersections microtubulaires dans différentes conditions d'activité de JNK dans des cellules HeLa (activée par l'anisomycine ou inhibée par le SP600125). La condition témoin correspond aux cellules ayant été traitées avec uniquement du DMSO.

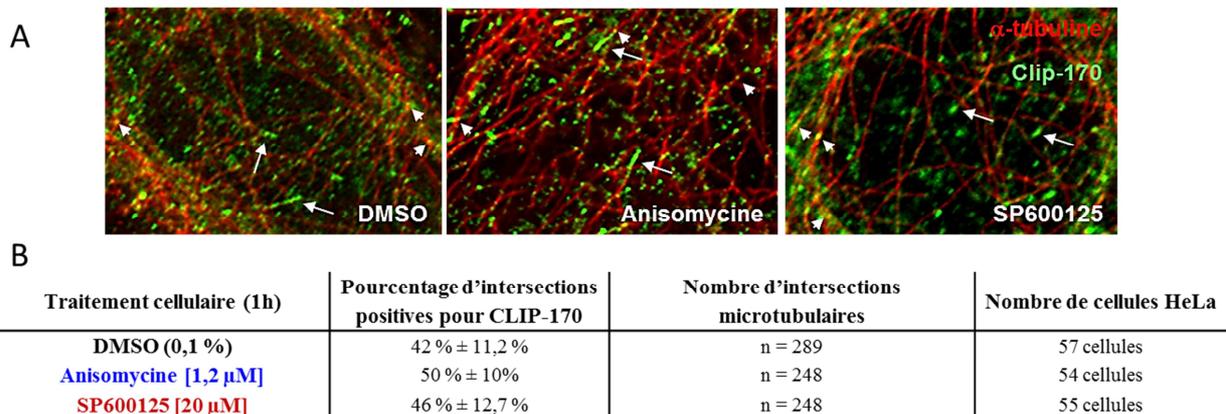
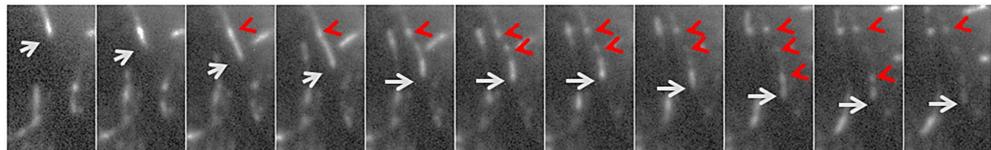


Figure 151 : Effet de l'activité de JNK sur la localisation de CLIP-170 endogène au niveau des croisements microtubulaires dans les cellules HeLa. Afin de moduler l'activité de JNK, les cellules sont traitées avec du DMSO (condition témoin), de l'anisomycine (activatrice), ou du SP600125 (inhibitrice). **(A)** Les cellules HeLa sont fixées et immunomarquées avec les anticorps α -tubuline clone DMA1 pour voir les microtubules (en rouge) et CLIP-170 #16134 pour voir CLIP-170 endogène (en vert). Les flèches blanches montrent la localisation de CLIP-170 au niveau des extrémités (+) des microtubules, tandis que les têtes de flèches pointent la localisation de CLIP-170 à des croisements microtubulaires. **(B)** Détermination du pourcentage d'intersections microtubulaires positives pour CLIP-170 endogène. Le nombre de cellules et d'intersections analysées sont indiquées dans le tableau (n = 2).

Comme attendu en condition témoin d'immunofluorescence, CLIP-170 endogène (en vert) se localise à l'extrémité (+) des MTs (flèches blanches), mais aussi de façon ponctuelle le long des MTs et au niveau des croisements microtubulaires (têtes de flèches blanches). Cette localisation reste inchangée en présence d'anisomycine (JNK actif) ou de SP600125 (JNK inactif) (cf. **Figure 151-A**). En effet, la quantification des croisements microtubulaires positifs pour CLIP-170 (cf. **Figure 151-B**) ne montre pas de différences importantes entre les trois conditions.

L'analyse en temps réel des comètes par vidéo-microscopie, a montré que derrière les comètes CLIP-170 des rétentions transitoires sont laissés, formant des points ponctuels dans la *lattice* des MTs (cf. **Figure 152**), qui ne sont pas affectées par l'état de phosphorylation des transgènes (T25A-S147A et T25E-S147E) (cf. **Figure 4 de l'article**). Nous avons analysé plus précisément la fragmentation de ces comètes en fonction de la phosphorylation, en quantifiant les fréquences de rétention temporelle et spatiale, la vitesse de croissance et le temps de rétention (cf. **Figure 152-B**), en utilisant des kymographes retraçant la trajectoire des comètes CLIP-170 (cf. **Figure 152-B**). Les kymographes ont été réalisés grâce à un *plugin* d'ImageJ à partir de films des comètes mCherry-CLIP-170 dans des cellules PtK2 (cf. **Figure 152-A**).

A Séquence d'images



B Kymographe

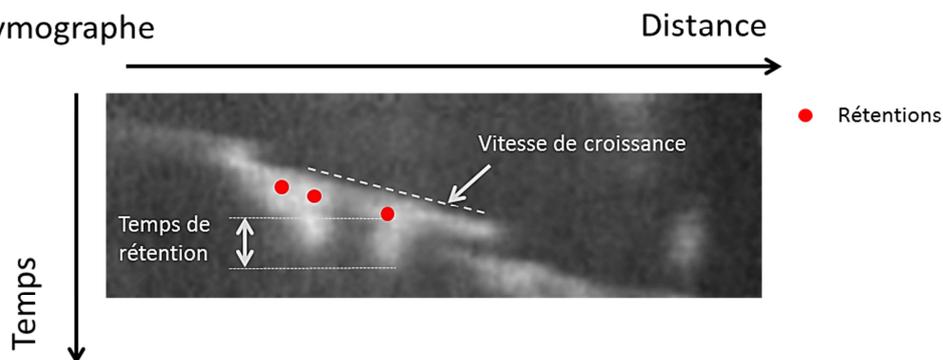


Figure 152 : Analyse de la fragmentation des comètes CLIP-170. (A) Séquence d'images montrant une comète CLIP-170 (flèche blanche) en croissance laissant persister transitoirement du signal (têtes de flèches rouges) sur son passage. (B) Kymographe d'une comète CLIP-170 sur lequel certains paramètres mesurés sont indiqués. La fréquence de rétention temporelle correspond au nombre de rétentions (points rouges) divisé par le temps total d'observation de la comète. La fréquence de rétention spatiale correspond au nombre de rétentions (points rouges) sur la distance totale parcouru par la comète. La pente sur le graphique donne la vitesse de croissance de la comète.

Les différents paramètres mesurés sont rassemblés dans le tableau ci-dessous (cf. **Tableau 31**). Nous n'avons pas observé de différences significatives sur les paramètres de rétention, entre les trois conditions, suggérant que la phosphorylation de CLIP-170 n'impacte pas

le comportement de fragmentation des comètes CLIP-170. Les comètes présentent cependant des différences de vitesse de croissance des MTs qui n'ont pas du tout été explorées. Ces résultats permettent donc de compléter les données qualitatives obtenues précédemment concernant l'allure des comètes CLIP-170.

Cellules PtK2 sur-exprimant mCherry-CLIP-170			
	WT	T25A-S147A	T25E-S147E
Fréquence de rétention temporelle (s ⁻¹)	0,0065 ± 0,0055	0,0074 ± 0,0051	0,0071 ± 0,0036
Fréquence de rétention spatiale (µm ⁻¹)	0,0678 ± 0,0412	0,0514 ± 0,0305	0,0419 ± 0,0199
Vitesse de croissance (µm/min)	5,9 ± 2,0	7,9 ± 1,7	10,1 ± 1,9
Temps de rétention (s)	19,6 ± 7,1	17,2 ± 9,4	16,7 ± 4,5
Nombre de comètes	511	431	492
Nombre d'évènements de rétentions	253	124	161
Nombre de cellules	16	16	19

Tableau 31 : Fragmentation des comètes CLIP-170. Les paramètres analysés sont exprimés en moyenne ± écart-type.

L'ensemble de ces données indique que la phosphorylation de CLIP-170 n'influence pas sa localisation dans les comètes et ses rétentions transitoires du signal derrière les comètes. Ceci signifie que l'état de phosphorylation de CLIP-170 n'affecterait pas la capacité de la protéine à reconnaître les futurs sites de sauvetage le long du corps des MTs. Cependant, l'analyse des paramètres de la fragmentation des comètes CLIP-170 est délicate car la surexpression de mCherry-CLIP-170, ainsi que la distribution spatiale des croisements microtubulaires peuvent influencer le comportement des comètes CLIP-170. Il a en effet été montré au laboratoire que dans les cellules RPE1, 80% des rétentions transitoires de CLIP-170 ont lieu aux croisements microtubulaires (De Forges *et al.*, 2016). Ainsi, le nombre de rétentions dépend fortement du nombre de MTs croisés par un MT lors de sa croissance. De ce fait, les paramètres quantifiés lors de cette analyse peuvent varier plus sûrement en fonction de la densité du réseau et du niveau d'expression du transgène que d'un changement de phosphorylation de CLIP-170.

Par ailleurs, nous avons observé que la modulation de l'activité de JNK ne semble pas altérer le réseau microtubulaire des cellules de façon drastique (en rouge Figure 151-A ; Daire *et al.*, 2009). Ceci est cohérent avec d'une part le fait que l'inhibition du facteur de sauvetage CLIP-170 endogène n'altère pas non plus le réseau de MTs (Komarova *et al.*, 2002a) et d'autre part que nos constructions T25A-S147A ou T25E-S147E n'altèrent pas non plus ce paramètre, bien qu'elles modifient les fréquences de sauvetage microtubulaire.

L'ensemble de ces données renforcent nos résultats montrant que la phosphorylation médiée par JNK de CLIP-170 n'influence pas l'organisation du réseau microtubulaire ni la localisation subcellulaire de la protéine. Il reste maintenant à comprendre comment la phosphorylation de CLIP-170 par JNK active les fréquences de sauvetage. Ce point est abordé dans la discussion concernant CLIP-170.

Discussions et perspectives concernant CLIP-170

En complément des données de la littérature indiquant que des phosphorylations de CLIP-170 peuvent réguler positivement sa liaison aux MTs (Choi *et al.*, 2002), son association avec le complexe dynéine/dynactine (Li *et al.*, 2010 ; Kedashiro *et al.*, 2015) ou le recrutement des kinétochores (Yang *et al.*, 2009 ; Amin *et al.*, 2014), nous avons démontré que trois acides aminés (Thr25, Thr45 et Ser147) dans le domaine H1 de CLIP-170 sont phosphorylés par JNK, en condition de stress et augmentent son activité de facteur de sauvetage. Dans les cellules, deux sortes de stress ont été utilisés pour activer les JNKs. Les stress courts (d'une heure) engendrés en traitant les cellules avec l'anisomycine ou le NaCl, ou encore en irradiant les cellules avec les UVC, induisent la phosphorylation de la Thr25 et la Ser147, aussi bien dans les cellules humaines (HeLa) que de rat-kangourou (PtK2). Les stress longs (de 24 heures) causés par la surexpression des constructions constitutivement actives de JNK1 α 1 et JNK2 α 2, provoquent la phosphorylation de ces deux résidus mais aussi de la Thr45 (cf. **Figure 1D de l'article**) et d'un quatrième site non caractérisé. Nous avons remarqué qu'au cours d'un stress long la Thr25 est mieux phosphorylée que lors d'un stress court. Nous n'avons pas distingué de différence d'efficacité de phosphorylation de CLIP-170 entre les deux isoformes des JNKs testées (courte : JNK1 α 1 et longue : JNK2 α 2). De manière basale, sans stress, le domaine H1 de CLIP-170 est phosphorylé sur la Ser147, ainsi que la Ser312, qui n'est pas un site consensus de phosphorylation pour JNK. Ces données sont en accord avec la littérature, indiquant que la Ser312 est phosphorylée par diverses kinases, telles que AMPK (Nakano *et al.*, 2010), PKA (Lee *et al.*, 2010), PRK, PKN1/3 (Collazos *et al.*, 2011) et Plk1 (Kakeno *et al.*, 2014). Les Thr25 et Thr45 ne sont pas phosphorylées de façon basale, elles sont donc stress-spécifiques, alors que la Ser147 est à la fois présente en condition basale est encore plus induite en condition de stress.

Nous montrons également que la Thr25, la Thr45 et la Ser147 sont phosphorylées *in vitro* par une JNK recombinante et que l'addition de dimères d' α/β -tubuline dans l'essai aide la kinase à phosphoryler ces trois acides aminés (cf. **Figures 2 de l'article et 147 des résultats complémentaires**). En revanche, la S312, comme attendu n'est pas phosphorylée *in vitro*. Ceci indique que la Thr25, Thr45 et Ser147 dans le domaine H1 de CLIP-170 sont directement phosphorylées par JNK *in vitro*, et que c'est probablement aussi le cas *in vivo*.

L'impact phénotypique de chacune de ces phosphorylations a montré qu'elles modulent la dynamique microtubulaire, en augmentant le sauvetage des MTs (cf. **Figure 3 de l'article**), sans pour autant modifier la localisation subcellulaire de la construction CLIP-170 transgénique, aussi bien dans les comètes, que dans les rétentions au niveau des croisements microtubulaires (cf. **Figure 4 de l'article**). Ces résultats avec des transgènes CLIP-170 dans les cellules épithéliales en interphase non déplétées pour la CLIP-170 endogène, sous-estiment peut-être l'effet réel de nos phosphorylations de CLIP-170 dans les cellules.

L'ensemble de ces données suggère que dans les cellules épithéliales de mammifères, les phosphorylations de CLIP-170 régulées par JNK en condition de stress, sur les résidus Thr25, Thr45 et Ser147 augmentent l'activité de sauvetage des MTs de la protéine, en induisant un changement conformationnel dans sa partie N-terminale, favorisant ainsi l'incorporation des dimères de tubuline dans le polymère. Ces résultats font suite aux travaux menés précédemment au laboratoire, montrant l'impact de JNK sur la dynamique des MTs en condition de stress (**Daire et al., 2009**). Ces nouvelles données montrent que CLIP-170 participe à la régulation de la dynamique des MTs, par JNK, en agissant sur les sauvetages et indique que ces deux protéines font partie de la même voie de signalisation. Ces résultats nous ont permis de construire un nouveau modèle de la régulation positive de la fréquence de sauvetage des MTs par la voie JNK/CLIP-170 dans les cellules épithéliales en interphase. Les phosphorylations dépendantes de JNK et leur action sur les sauvetages y sont représentées lorsque la protéine est cytosolique ou attachée aux MTs (cf. **Figure 153**).

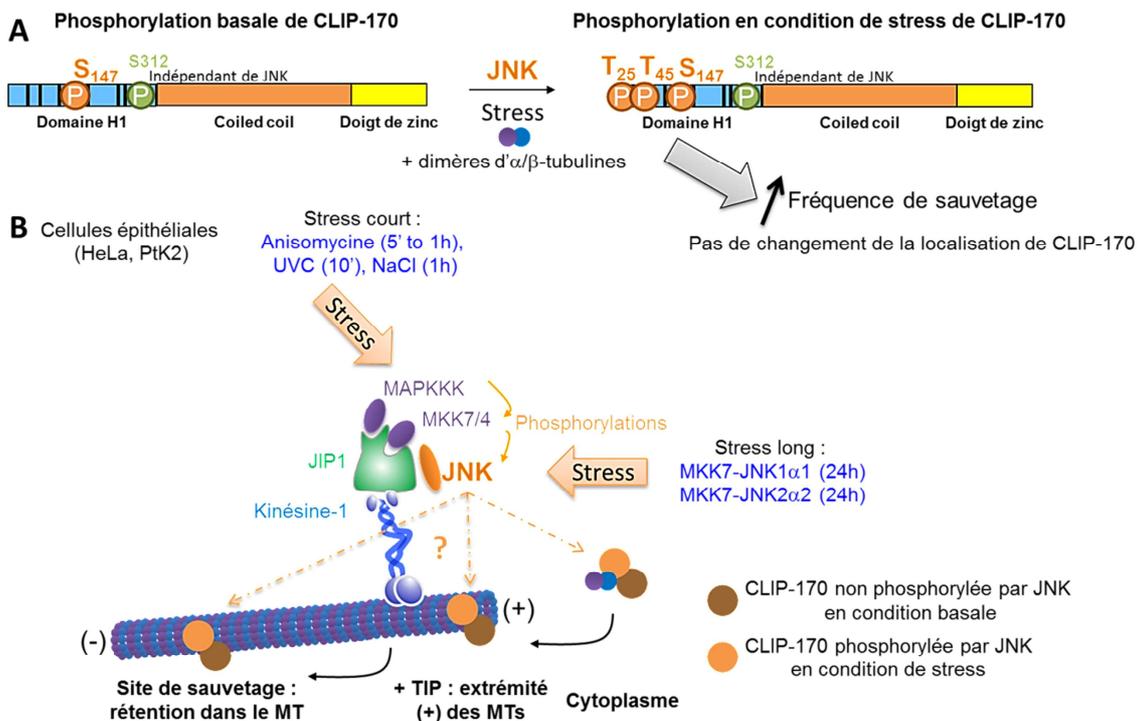


Figure 153 : Régulation positive de la dynamique des microtubules par la voie JNK/CLIP-170 dans les cellules épithéliales en interphase. (A) En condition basale, sans stress, CLIP-170 est phosphorylée sur la Ser147 et la Ser312. En condition de stress, les Thr25, Thr45 et Ser147 sont phosphorylées par JNK et l'ajout de tubuline dans le système *in vitro* aide la kinase à phosphoryler ses substrats. Lorsque CLIP-170 est phosphorylée, les fréquences de sauvetage sont augmentées, sans que sa localisation subcellulaire ne soit modifiée et sans altérer l'organisation du réseau microtubulaire (B) D'après les données de **Daire et al., (2009)**, JNK peut être activée dans l'environnement microtubulaire via son interaction avec le complexe JIP-1/kinésine-1. Par ailleurs, indépendamment de son état de phosphorylation, CLIP-170 est retrouvée, aussi bien dans le cytoplasme (associée ou non aux dimères de tubuline), qu'au niveau des extrémités (+) des MTs et des sites de rétention qui sont des futurs sites de sauvetage. Les phosphorylations de CLIP-170 peuvent donc se faire soit dans le cytoplasme où se trouve JNK, soit sur les MTs, via le recrutement de la kinase par la kinésine.

Il est important de noter que les nouveaux sites identifiés dans cette étude (Thr25, Thr45 et Ser147) sont des sites consensus de phosphorylation pour JNK, c'est-à-dire des sites TP ou SP. Des alignements de séquences de CLIP-170 dans différentes espèces (cf. **Annexe IV**) ont montré que la Ser147 est conservée dans la souris, le rat, le poulet, le rat-kangourou, le xénope et la drosophile, tandis que la Thr25 est conservée chez la souris et le rat et qu'enfin la Thr45 est conservée chez le rat-kangourou et le poisson zèbre. Quant à la Ser312, elle est conservée chez la souris, le rat, le poulet, le rat-kangourou, le xénope et le poisson zèbre. Ces sites ne sont pas retrouvés chez les levures (*S. cerevisiae* et *S. pombe*). Cependant, chez les différentes espèces observées, plusieurs sites consensus de phosphorylation pour JNK (SP/TP) sont retrouvés dans les domaines N-terminaux correspondant à H1 (cf. **Tableau 32**). Excepté pour le poisson zèbre, toutes les espèces considérées, présentent des sites SP/TP entre les deux CAP-Gly, ou après leur premier CAP-Gly pour les levures. À la place, pour le poisson zèbre, on retrouve un site SP dans le premier CAP-Gly. Enfin, chez le xénope, le poulet et les levures on ne retrouve pas de sites SP/TP en amont du premier CAP-Gly, alors que dans les autres espèces oui.

Espèces	Nombre de sites SP/TP dans le domaine H1	Numéro d'accèsion NCBI
Humain	9	NP_002947
Souris	8	NP_001334397
Rat	8	NP_113933
Rat-kangourou	8	XM_013023065
Poulet	7	NP_990273.1
Xénope	9	NP_001096260.1
Poisson zèbre (CLIP1a)	7	XP_009300270.1
Drosophile (D-CLIP-190)	11	NP_609835.2
Levure bourgeonnante : <i>S. cerevisiae</i> (Bik1)	3	KZV12822.1
Levure fusionnante : <i>S. pombe</i> (Tip1)	3	CAA68217.1

Tableau 32 : Nombre de sites consensus de phosphorylation pour JNK (SP/TP) dans le domaine H1 de CLIP-170 chez différentes espèces.

Au cours de ces travaux, nous avons montré que la phosphorylation de la construction CLIP-170 transgénique par JNK augmente le sauvetage des MTs, dans des cellules exprimant la CLIP-170 endogène. Ces nouvelles phosphorylations n'affectent pas la localisation de CLIP-170 dans l'environnement microtubulaire, suggérant qu'elles ne modifient pas l'affinité des CAP-Gly pour les MTs ou la tubuline. Dans la littérature, plusieurs études montrent que la phosphorylation de la Ser312 de CLIP-170 est impliquée dans l'inhibition de son activité, en engendrant une diminution de son affinité pour les MTs ou ses partenaires protéiques, via l'induction de son repliement moléculaire (**Nakano et al., 2010 ; Lee et al., 2010 ; Collazos et al., 2011 ; Kakeno et al., 2014 ; Nirschl et al., 2016**). En effet, dans les cellules, CLIP-170 adopte une conformation fermée par repliement moléculaire de la protéine sur elle-même via une interaction intramoléculaire entre ses domaines C- et N-terminaux (**Lansbergen et al., 2004**). Nous avons observé ici que dans les cellules HeLa, en condition basale, la Ser312 dans le transgène H1 est faiblement phosphorylée (20 à 30 %) et ceci de façon indépendante de JNK, un état qui n'est pas changé en condition de stress activateur de la kinase. Le fait d'utiliser des protéines H1 transgéniques sans domaine C-terminal et par ailleurs de voir que la phosphorylation de la Ser312

n'est pas affectée sous stress, suggère fortement que notre activation de CLIP-170 ne passe pas par l'inhibition du repliement intramoléculaire entre les extrémités N- et C-terminales. Dans nos expériences, la protéine H1, même si elle peut théoriquement interagir avec les extrémités C-terminales des protéines CLIP-170 endogènes, est capable de lier les MTs indépendamment de son niveau de phosphorylation par JNK. Ceci suggère que les domaines CAP-Gly du transgène sont libres pour se fixer aux bouts (+) et ainsi favoriser le sauvetage des MTs. De plus, les phosphorylations induites par JNK ne sont pas dans la troisième région riche en sérines connue pour refermer CLIP-170 (Lee *et al.*, 2010 ; Nirschl *et al.*, 2016).

Toutefois, afin de vérifier que la liaison du domaine H1 transgénique à la CLIP-170 endogène est inchangée par phosphorylation, nous pourrions réaliser des expériences de co-immunoprécipitation entre ces deux partenaires. Nous prévoyons aussi de nous affranchir au maximum de la présence de CLIP-170 endogène par siRNA, pour regarder uniquement l'effet des transgènes H1 (T25A-S147A et T25E-S147E, mais aussi S147A et S147E) sur les fréquences de sauvetage de MTs.

L'étape suivante de ces travaux sera de déterminer si l'activité de sauvetage des MTs est contrôlée uniquement par CLIP-170, ou si d'autres +TIPs partenaires de CLIP-170 sont nécessaire pour favoriser le sauvetage des MTs. La protéine CLIP-170 entière avec ses domaines N- et C-terminaux peut lier des partenaires, tels que les facteurs de sauvetage CLASP et CLIP-115, ou p150^{Glued}, ou des polymérases comme SLAIN2 et ch-TOG qui pourraient favoriser la re-polymérisation des MTs. Dans les cellules de mammifères, les protéines CLASPs et CLIPs augmentent le sauvetage des MTs, en favorisant la re-polymérisation (Komarova *et al.*, 2002a ; Mimori-Kiyosue *et al.*, 2005 ; cf. Tableau 33). Dans ce travail, nous avons vu que la phosphorylation de CLIP-170 par JNK sur la Thr45 et Thr25 augmente le sauvetage, en promouvant la re-polymérisation (cf. Tableau 33). Lorsque CLIP-170 est inhibée (par le dominant négatif Δ Head, dépourvu du domaine N-terminal H1), la construction H1 restaure les événements de sauvetage sans recruter CLIP-115, CLASP2 ou p150^{Glued} qui nécessitent la région C-terminale (Komarova *et al.*, 2002a), mais en recrutant probablement SLAIN2 et ch-TOG. Ainsi, les protéines SLAIN2 et ch-TOG, et éventuellement CLASPs et CLIP-115 peuvent être envisagées comme des partenaires potentiels pour participer au sauvetage des MTs en réponse à JNK en condition de stress.

	Augmente	Diminue	Pas d'effet
CLIP-170/CLIP-115 (Komarova <i>et al.</i> , 2002a)	S to G 	G to S 	
CLASPs (Mimori-Kiyosue <i>et al.</i> , 2005)	S to G  G to S 	P to G 	G to P  S to P  P to S 
Nos données : T45E (et T25E) S147E (et T25E)	S to G  S to P to G 		S to P to S  S to P to S 

Tableau 33 : Effets des facteurs des CLASPs et CLIPs dans le sauvetage des microtubule (S : *Shortening*, G : *Growth*, P : *Pause*) (d'après Komarova *et al.*, 2002a ; Mimori-Kiyosue *et al.*, 2005).

Pour valider cette hypothèse, nous pourrions réaliser des expériences de co-immunoprécipitation avec les constructions non-phosphorylables et phospho-mimétiques de H1 et de CLIP-170 entière. De façon plus exhaustive, nous pourrions également rechercher en spectrométrie de masse les partenaires spécifiques de CLIP-170 en fonction de son état de phosphorylation. En outre, si aucun partenaire n'est impliqué, il sera possible de le démontrer formellement dans un système reconstitué *in vitro* de la dynamique des MTs.

Par ailleurs, nous pouvons supposer que la phosphorylation de ces nouveaux sites par JNK dans le domaine H1 de CLIP-170 induit un changement de la conformation à proximité de ses CAP-Gly. Ceci modifierait l'interaction avec la tubuline et améliorerait l'incorporation des dimères de tubuline aux extrémités (+) des MTs, expliquant l'augmentation des sauvetages. Pour répondre à cette question, des études structurales de la partie N-terminale de CLIP-170 peuvent être envisagées. À ce jour, la cristallisation de ce domaine n'a jamais été obtenue, du fait que les régions entourant les CAP-Gly sont très flexibles. En supposant que le changement conformationnel potentiel, induit par les phosphorylations identifiées dans les régions riches en sérines, aide à structurer ces régions, cela pourrait aider à cristalliser la tête de CLIP-170. La co-cristallisation avec des dimères de tubuline permettrait peut-être de voir si la protéine CLIP-170 phosphorylée permet d'apporter le dimère sous un meilleur angle dans le polymère.

Concernant la phosphorylation de CLIP-170 endogène, étant donné la taille de la protéine, il nous a été difficile de suivre sa phosphorylation en fonction de l'activité de JNK. Cependant, nous avons observé une diminution de la phosphorylation globale de CLIP-170 lors de l'inhibition de JNK dans les cellules. Ces données suggèrent que CLIP-170 endogène est phosphorylée de façon basale sur un ou plusieurs des sites que nous avons caractérisés. Par ailleurs, dans le transgène H1, la phosphorylation basale de la Ser147 peut être partiellement réduite en présence de l'inhibiteur SP600125 de JNK (données non montrées). La phosphorylation basale restante semblerait dépendante de la kinase GSK3 β , puisque le chlorure de lithium, utilisé en co-traitement avec SP600125 abolit quasiment toute phosphorylation (données non montrées). De plus, nous avons mis en évidence que la phosphorylation basale de CLIP-170 endogène chez le rat-kangourou (qui ne possède pas la Thr25) est moins sensible à

l'activité de JNK. Ces données confirment le fait que CLIP-170 est une phosphoprotéine (**Rickard and Kreis, 1990 ; Rickard and Kreis, 1991**) qui est phosphorylée par diverses kinases, dont JNK, qui participe au maintien d'un état basal de phosphorylation dans les cellules. Afin de caractériser plus précisément quels sont les sites endogènes phosphorylés par JNK en conditions basale et de stress, il faudra utiliser des anticorps spécifiques des sites identifiés dans cette étude.

La phosphorylation de la Thr45, ne fonctionne pas exactement comme celle des autres résidus. En effet, dans les cellules, ce résidu est phosphorylé après un long stress (24h), tandis que la Thr25 et la Ser147 sont phosphorylées respectivement, dès 5 minutes ou après 30 minutes d'activation de JNK. En lien avec ce qui est décrit dans la littérature, le temps d'activation de JNK influence la phosphorylation de ses substrats, ainsi que la réponse cellulaire. Une activation de moins d'une heure engendre la survie, alors qu'une activation de plus d'une heure induit l'apoptose des cellules (**Ventura et al., 2006**). Ainsi, la phosphorylation de la Thr45 suite à un stress long corrèle probablement avec la mort cellulaire. Cette hypothèse est supportée par le fait que les constructions constitutivement actives Flag-MKK7-JNK exprimées de 48h à 72h, induisent la mort des cellules. Par ailleurs, les cellules exprimant CLIP-170 T45E ont une fréquence de sauvetage plus élevée que les autres phospho-mimétiques. Nous pourrions vérifier d'une part si cette phosphorylation mimée de la Thr45 est moins viable à 24h que celles des Thr25 et Ser147, et d'autre part si elle induit plus de défauts du réseau microtubulaire.

Nous avons montré que les acides aminés phosphorylés dans le domaine H1 de CLIP-170 identifiés dans les cellules épithéliales sont directement phosphorylés dans un système *in vitro* avec une kinase recombinante ayant une activité enzymatique élevée et que cette phosphorylation est augmentée en présence de tubuline. De plus, nous avons vu que la Thr25 est le seul site qui est phosphorylé *in vitro* par une kinase recombinante ayant une faible activité en présence de dimères de tubuline, démontrant que ce site est le substrat de JNK le plus accessible *in vitro*. Néanmoins, nous n'avons pas identifié le mécanisme exact expliquant l'effet de l'ajout des dimères de tubuline sur la phosphorylation. Comme le domaine CAP-Gly-1 de CLIP-170 a moins d'affinité pour la tubuline que le domaine CAP-Gly-2 (**Mishima et al., 2007**), nous envisageons que la liaison de la tubuline au CAP-Gly-2 permet à la première région riche en sérines contenant la Thr25 et la Thr45 d'être plus accessible à la kinase, ainsi que la deuxième région riche en sérines, contenant la Ser147. Par ailleurs, dans les cellules, nous avons montré que la phosphorylation de la Thr25 par JNK est rapidement induite par le stress. Ces expériences cellulaires suggèrent donc que la Thr25 semble être plus facilement accessible à la kinase en condition de stress. En revanche, en condition basale, seule la Ser147 est phosphorylée par JNK, suggérant que ce site est le plus accessible en absence de stress.

On peut faire aussi l'hypothèse que CLIP-170 est un substrat direct, mais faible de JNK car il ne possède pas de séquence de *docking* permettant la reconnaissance du motif D de la kinase, augmentant son affinité pour ses substrats (**Zeke et al., 2016**). Effectivement, en absence de tubuline, les Thr45 et Ser147 ne sont pas complètement phosphorylées, même avec une JNK

recombinante très active, suggérant que la kinase ne se fixe pas bien à son substrat. Nous avons vu que l'ajout de dimères d' α/β -tubulines aide JNK à phosphoryler ces acides aminés. Ainsi, nous supposons que CLIP-170 utilise la tubuline comme protéine d'échafaudage pour favoriser son interaction avec la kinase activée. Cette observation permettrait d'expliquer pourquoi en présence de dimère de tubuline dans le système *in vitro*, la phosphorylation de CLIP-170 est augmentée.

Nous avons également montré que les modifications de la phosphorylation de CLIP-170 n'altèrent pas sa localisation aussi bien au niveau des extrémités (+) des MTs, qu'au niveau des intersections microtubulaires. CLIP-170 est recrutée aux bouts (+) des MTs en croissance, en liant via ses domaines CAP-Gly le motif C-terminal EEY/F de la tubuline (Arnal *et al.*, 2004 ; Folker *et al.*, 2005 ; Peris *et al.*, 2006) ou d'EB1 (Komarova *et al.*, 2005 ; Bieling *et al.*, 2008 ; Dixit *et al.*, 2009) et aussi la queue C-terminale de SLAIN2 (séquence WKDGCY, van des Vaart *et al.*, 2011). Comme l'accumulation de CLIP-170 aux comètes n'est pas altérée, nous supposons que son recrutement par les protéines tubuline, EB et/ou SLAIN2, et donc son affinité pour les extrémités C-terminales de ses protéines, ne sont pas modifiés. De plus, malgré un effet fort sur les sauvetages, les phosphorylations n'ont pas d'effet sur l'organisation générale du réseau microtubulaire interphasique. Il est important de noter que l'observation qualitative de ces données a été réalisée dans des cellules non déplétées en CLIP-170 endogène. Ainsi, l'absence d'effets de la phosphorylation sur le réseau des MTs sont à prendre avec précaution car ils sont peut-être masqués par la présence de la protéine endogène. Toutefois, on notera que l'inhibition de JNK avec le SP600125 n'affecte pas le réseau microtubulaire (Daire *et al.*, 2009). De plus, l'inhibition de CLIP-170 (avec la construction dominante négative CLIP-170- Δ Head) altère les sauvetages des MTs sans affecter nettement le réseau microtubulaire. Les MTs peuvent probablement persister dans cette condition car des protéines +TIP, telles que CLASP2 et EB1 restent sur les extrémités (+) des MTs (Komarova *et al.*, 2002a).

Un autre point important sera de comprendre *in vivo* si les phosphorylations du domaine H1 de CLIP-170 sont réalisées au niveau d'un site préférentiel qui pourrait être, le cytoplasme, les extrémités (+) des MTs et/ou les sites de sauvetage potentiels correspondant à des rétentions de CLIP-170 laissées derrière la comète. Les données préliminaires de phosphorylation *in vitro* obtenues avec de la tubuline sous forme de monomère, dimère ou polymère, suggèrent que les phosphorylations de la Thr25 et de la Ser147 de CLIP-170 se font préférentiellement en présence de tubuline, que celle-ci soit polymérisée ou non. Le développement et la caractérisation d'un ou plusieurs anticorps recombinant(s) spécifique(s) des sites de phosphorylation, permettra de répondre à cette question en visualisant la localisation de la protéine phosphorylée dans les cellules.

Une autre perspective sera d'identifier si ces phosphorylations dépendantes de JNK ont des effets sur certaines fonctions physiologiques de CLIP-170 connues, comme la congression et l'alignement des chromosomes, en interagissant avec les kinétochores lors la mitose (Tanenbaum *et al.*, 2006 ; Amin *et al.*, 2015), ou encore le transport cellulaire, en recrutant les

cargaisons de la dynéine/dynactine aux bouts (+) des MTs (**Moughamian *et al.*, 2013**). CLIP-170 s'associe avec les kinétochores en mitose et recrute ses cargaisons en interphase, en interagissant avec p150^{Glued} via son domaine C-terminal (**Wittman and Desai, 2005 ; Weisbrich *et al.*, 2007**). Ceci suggère que les phosphorylations dans la partie N-terminale identifiées dans cette étude ne vont probablement pas altérer ces fonctions physiologiques de CLIP-170.

Enfin, pour conclure, d'autres protéines (**Steinmetz and Akhmanova, 2008**) ont des CAP-Gly consécutifs (CLIP-115, CLIPR-59, CLIP4, CYLD) ou uniques (p150^{Glued}, KIF13B) associés à des sites consensus pour JNK, et ce travail soulève donc éventuellement la possibilité que ces CAP-Gly pourraient aussi être régulés par JNK en condition basale ou de stress (cf. **page 287**).

Deuxième partie : La β -tubuline comme nouveau substrat potentiel de JNK ?

Dans cette seconde partie, nous nous sommes intéressés à la phosphorylation de la β -tubuline par JNK. Comme les travaux précédents réalisés au laboratoire ont montré que JNK stimule la vitesse de polymérisation des microtubules dans les cellules épithéliales (**Daire *et al.*, 2009**), notre hypothèse la plus simple était que la tubuline soit un nouveau substrat de JNK, sa phosphorylation exerçant directement des effets sur la dynamique des MTs, par exemple, du fait d'une modulation de l'incorporation des dimères d' α/β -tubulines dans les MTs.

Nous nous sommes spécifiquement intéressés à la β -tubuline et à non l' α -tubuline car cette dernière ne possède pas de site consensus de phosphorylation (SP ou TP) pour JNK, tandis que, la β -tubuline possède deux sites consensus de phosphorylation pour JNK, la S172 et la T219, conservés dans ses différentes isoformes (cf. **Figure 154**).

		S172		T219	
Tubulin β I	161	DRIMNTFSVVP	SPKVSDTVV---211	CFRTLKLTTP	TYGDLNHLVS
Tubulin β II	161	DRIMNTFSVMP	SPKVSDTVV---211	CFRTLKLTTP	TYGDLNHLVS
Tubulin β III	161	DRIMNTFSVVP	SPKVSDTVV---211	CFRTLKLTATP	TYGDLNHLVS
Tubulin β IVa	161	DRIMNTFSVVP	SPKVSDTVV---211	CFRTLKLTTP	TYGDLNHLVS
Tubulin βIVb	161	DRIMNTFSVVP	SPKVSDTVV---211	CFRTLKLTTP	TYGDLNHLVS
Tubulin β V	161	DRIMNTFSVMP	SPKVSDTVV---211	CFRTLKLTTP	TYGDLNHLVS
Tubulin β VI	161	DRIMNSFSVMP	SPKVSDTVV---211	CFRTLKLTTP	TYGDLNHLVS
		***** : *** : *****		***** : *****	

Figure 154 : Alignement des séquences peptidiques des différentes isoformes de la β -tubuline. Les deux sites consensus de phosphorylation pour JNK (SP ou TP), soit la Ser172 et la Thr219 sont surlignés en jaune sur la figure. Au laboratoire, nous avons principalement étudié l'isotype tubuline- β IVb.

Nous nous sommes plus particulièrement intéressés à la phosphorylation de la Thr219 par JNK, car la phosphorylation de la Ser172 a déjà été décrite dans la littérature. Cette dernière est dépendante de Cdk1 pendant la mitose et empêche l'incorporation de la tubuline dans les MTs (**Fourest-Lieuvin *et al.*, 2006**). Ne pouvant exclure a priori que cette sérine soit aussi phosphorylable par JNK, nous l'avons quand même analysée lors d'expériences de phosphorylation *in vitro*.

I - Etude de la phosphorylation de la β -tubuline médiée par JNK dans les cellules HeLa

Afin de déterminer si la β -tubuline est un nouveau substrat de JNK, nous avons travaillé avec des cellules épithéliales humaines (HeLa). L'activité de JNK a été modulée via l'anisomycine, le SP600125 et les constructions constitutivement actives de JNK1 α 1 et JNK2 α 2, pour analyser son impact sur la phosphorylation de la β -tubuline.

A - Analyse de la phosphorylation de la β -tubuline endogène dans les cellules HeLa

Tout d'abord, nous avons analysé la phosphorylation de la β -tubuline endogène en traitant les cellules HeLa avec des activateurs ou inhibiteurs de JNK. Les échantillons sont déposés sur un gel SDS-PAGE contenant du PhosTagTM.

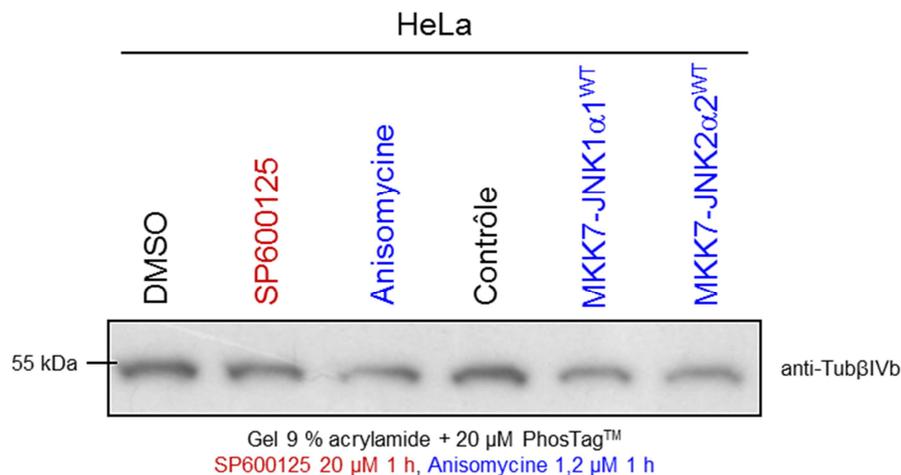


Figure 155 : Étude de la phosphorylation de la β -tubuline endogène par JNK. Western-blot (gel 9 % acrylamide + 20 μ M PhosTagTM) d'extraits cellulaires traités avec des activateurs (anisomycine, Flag-MKK7-JNK1 α 1^{WT} et Flag-MKK7-JNK2 α 2^{WT}) ou un inhibiteur (SP600125) de JNK. Le Western-blot montre la β -tubulineIVb endogène des cellules HeLa.

Le Western-blot (cf. **Figure 155**), ne montre pas de retard de migration dû à des phosphorylations de la β -tubulineIVb endogène entre les conditions d'activation (anisomycine, Flag-MKK7-JNK1 α 1^{WT} ou Flag-MKK7-JNK2 α 2^{WT}) malgré la présence de PhosTagTM. Parallèlement, l'inhibition de JNK (SP600125) ne montre pas de migration plus rapide de la tubuline.

L'absence d'effet sur la migration de la β -tubuline peut être due à un manque de sensibilité de la technique liée au fait que dans la cellule la β -tubuline est très peu phosphorylée et que nous n'arrivons pas à détecter cette faible phosphorylation. De plus, il arrive que le PhosTagTM ne fonctionne pas avec certaines phospho-protéines (**Kinoshita *et al.*, 2009**). Ainsi, dans nos conditions la β -tubuline n'est pas phosphorylée par JNK dans les cellules HeLa.

Nous n'avons donc pas réussi à mettre en évidence la phosphorylation de la β -tubuline endogène par JNK dans les cellules épithéliales humaines (HeLa) au moyen d'expériences de retard sur gel.

B - Phosphorylation de la β -tubuline endogène dans des extraits microtubulaires de cellules HeLa

Pour contourner un éventuel problème de bas niveau de phosphorylation de la β -tubuline endogène, nous avons répété l'expérience précédente sur des cellules surexprimant la GFP-Tub β IVb^{WT}, puis préparé des extraits microtubulaires totaux et des extraits cytosoliques. Ces extraits ont ensuite été concentrés en diminuant leur volume total afin de les enrichir notamment en tubuline. L'analyse par Western-blot de ces fractions concentrées a été effectuée sur trois gels différents révélés avec trois anticorps : anti-GFP pour vérifier l'expression du transgène, anti-P-Thréonine pour détecter une éventuelle phosphorylation de la Thr219 et anti- α -tubuline (DM1A) pour valider le fractionnement et l'enrichissement en tubuline des extraits microtubulaires.

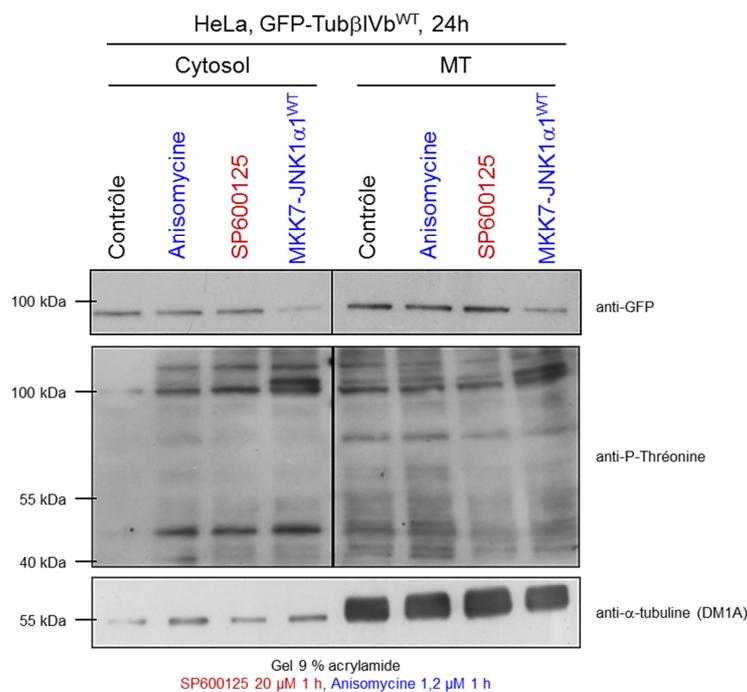


Figure 156 : Analyse de la phosphorylation de la β -tubuline endogène par JNK dans des extraits cytosoliques et microtubulaires de cellules HeLa. Western-blots (gels 9 % acrylamide) sur des extraits cytosoliques et microtubulaires de cellules traitées avec des activateurs (anisomycine ou Flag-MKK7-JNK1 α 1^{WT}) ou un inhibiteur (SP600125) de JNK. Les Western-blots sont hybridés avec les anticorps anti-GFP, anti-P-Thréonine et anti- α -tubuline (DM1A). (10 μ g de protéines totales sont déposés pour la révélation avec les anticorps anti-GFP et anti- α -tubuline (DM1A) ; 20 μ g de protéines totales sont déposés pour la révélation avec l'anticorps P-Thréonine).

Nous pouvons tout d'abord observer (cf. **Figure 156**) qu'il y a plus d' α -tubuline dans les fractions microtubulaires (MT) que dans les fractions cytosoliques (Cytosol). Cela est vrai pour les différentes conditions. Cette observation, nous permet de confirmer un enrichissement en

tubuline dans les fractions microtubulaires (MT). Le contrôle de l'expression du transgène avec un anticorps anti-GFP montre ensuite que la GFP-Tub β IVb^{WT} (bande à environ 100 kDa) a bien été exprimée et qu'elle se retrouve dans le Cytosol. Elle est par ailleurs incorporée dans les MTs mais en proportion très faible par rapport à la quantité de tubuline totale. Nous pouvons remarquer que pour la condition d'activation avec Flag-MKK7-JNK1 α 1^{WT}, la bande correspondante à GFP-Tub β IVb^{WT} est de plus faible intensité (cf. **Figure 156**). Cela est probablement dû au fait que les cellules sont doublement transfectées. L'analyse avec l'anticorps anti-P-Thréonine montre différentes bandes. À environ 100 kDa, soit la masse moléculaire apparente du transgène (GFP-Tub β IVb^{WT}) une bande de plus forte intensité est observable dans les différents puits. Néanmoins, cette bande semble ne pas correspondre à la GFP-Tub β IVb^{WT}, car sur le Western-blot hybridé avec l'anticorps anti-GFP, la construction migre un peu en dessous de la bande à 100 kDa du marqueur de taille (cf. **Figure 156**). De plus, l'intensité de cette bande n'est pas modifiée par l'activation ou l'inhibition de JNK. Pour la condition Flag-MKK7-JNK1 α 1^{WT}, nous observons une bande au-dessus de celle à 100 kDa. Celle-ci correspond probablement à la construction constitutivement active JNK1 α 1 phosphorylé sur la Thr183. Aucune bande autour de 55 kDa n'est clairement observable, ce qui semble éliminer la possibilité d'une phosphorylation de la β -tubuline endogène. En revanche, des bandes autour de 54 et 46 kDa qui pourraient correspondre aux JNK1 α 1 et JNK2 α 2 endogènes phosphorylées sur leurs résidus Thr183 sont détectées principalement dans la fraction cytosolique.

Cette expérience a été reproduite pour visualiser uniquement un effet potentiel sur la tubuline endogène (donc sans surexpression de la GFP-Tub β IVb^{WT}) et uniquement en réponse à l'anisomycine (cf. **Figure 157**).

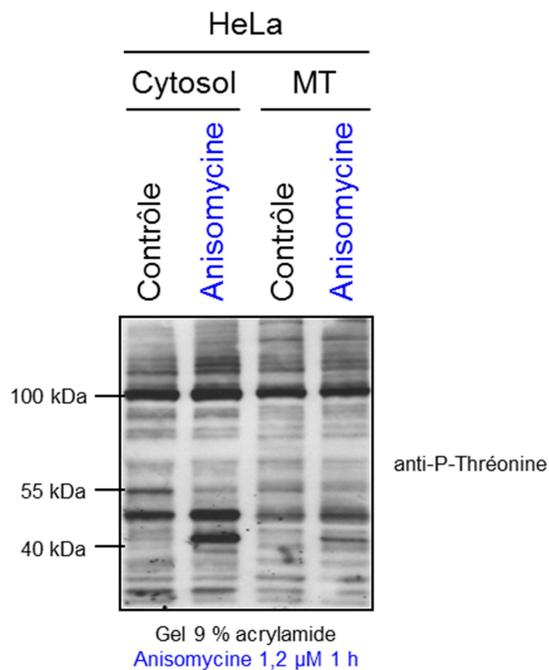


Figure 157 : Observation de la phosphorylation de la β -tubuline endogène régulée par JNK. Western-blot (gel 9 % acrylamide) sur des extraits microtubulaires et cytosoliques de cellules traitées ou non avec l'activateur de JNK (anisomycine). Western-blot hybridé avec l'anticorps anti-P-Thréonine. (20 μ g de protéines totales sont déposés pour les fractions cytosoliques (Cytosol) et 10 μ g de protéines totales sont déposés pour les fractions microtubulaires (MT)).

Comme précédemment (cf. **Figure 156**), l'anticorps anti-P-Thréonine révèle plusieurs bandes (cf. **Figure 157**). Au environ de 46 kDa, deux bandes plus intenses apparaissent après activation de JNK par l'anisomycine, notamment dans la fraction cytosolique. Si ces bandes correspondent à JNK1 et JNK2 endogènes phosphorylées sur la Thr183, elles sont très peu recrutées sur les MTs. La phosphorylation de protéines à 55 kDa est détectable, plus clairement que lors de la première expérience (cf. **Figure 156**), mais elle n'est pas induite par l'activation de JNK.

Il est donc très probable que la β -tubuline endogène, même si elle présente un degré de phosphorylation basal détectable, ne soit pas phosphorylée après activation de JNK.

En conclusion, l'enrichissement en tubuline d'extraits microtubulaires n'a pas permis d'observer la phosphorylation de la β -tubuline par la JNK activée dans les cellules HeLa. Si cette phosphorylation existe néanmoins dans de faibles proportions, il est possible que les approches utilisées n'aient pas permis de la détecter.

C - Etude de la phosphorylation de la β -tubuline surexprimée dans des cellules Hela et immunoprécipitée par GFP-Trap®

Une troisième tentative pour abaisser le seuil de détection de la phospho- β -tubuline a consisté à procéder sur de la GFP-Tub β IVb^{WT} purifiée par GFP-Trap® et à réaliser en parallèle, une expérience de phosphorylation *in vitro* dans un système réduit et contrôlé. Pour cela, nous avons utilisé de la tubuline de cerveau de porc purifiée et la kinase (JNK) constitutivement active purifiée. La phosphorylation potentielle de la Thr219 a été testée en Western-blot avec l'anticorps anti-P-Thréonine. Il est important de préciser que dans nos conditions, l'immunoprécipitation de la β -tubuline par GFP-Trap® ne permet pas, en principe, de conserver l'interaction avec l' α -tubuline, en raison de l'utilisation de tampon Tris-HCl qui dissocie les dimères d' α/β -tubuline (**Giraudel et al., 1998**).

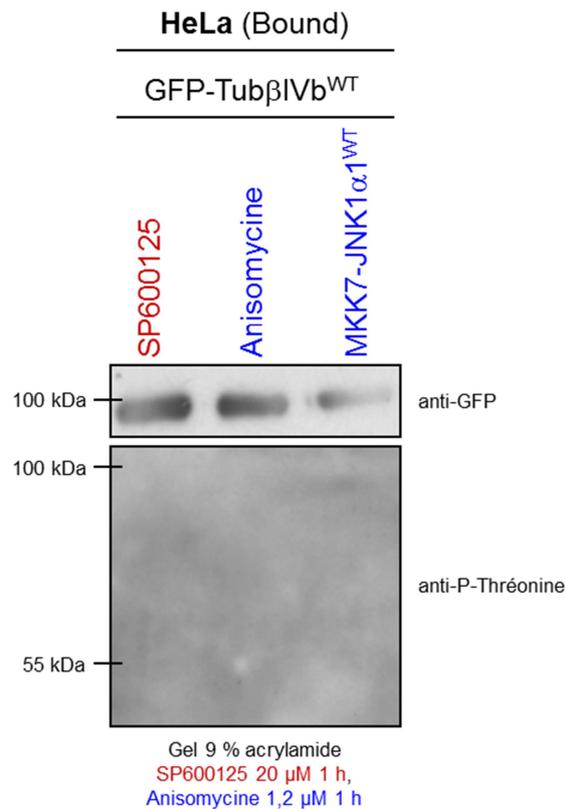


Figure 158 : Analyse de la phosphorylation de la β -tubuline sur des résidus thréonine dans les cellules HeLa. Western-blots (gels 9 % acrylamide) avec GFP-Tub β IV^{WT} surexprimée dans les cellules HeLa et purifié par GFP-Trap®. Les cellules ont été traitées avec un inhibiteur (SP600125) ou des activateurs (Anisomycine et Flag-MKK7-JNK1 α 1^{WT}) de JNK. Les Western-blots sont révélés avec les anticorps anti-GFP et anti-P-Thréonine.

Malgré l'enrichissement en GFP-tubuline- β IVb^{WT} par immunoprécipitation, il n'a encore une fois pas été possible de détecter la phosphorylation de la β -tubuline sur des résidus thréonine (cf. **Figure 158-A**).

Nous avons aussi vérifié que l'anticorps anti-P-thréonine était bien fonctionnel (cf. **Figure 159-A**) car des bandes de tubuline ont bien été détectées avec cet anticorps dans l'ensemble des conditions des expériences de phosphorylation *in vitro*. En présence de JNK, la phosphorylation *in vitro* de la tubuline de cerveau de porc semble par ailleurs augmenter, la bande étant plus intense que celle du témoin (cf. **Figure 159-A**).

En conclusion, malgré plusieurs tentatives pour augmenter la sensibilité des méthodes utilisées, l'ensemble des expériences n'a pas permis de mettre en évidence la phosphorylation de la β -tubuline par JNK dans des cellules épithéliales humaines.

Cependant, nous ne pouvons pas totalement exclure une phosphorylation très discrète de résidus thréonine de la β -tubuline par JNK *in vivo* car cette phosphorylation semble fonctionner *in vitro*. C'est pourquoi nous avons souhaité approfondir cette étude *in vitro*.

II - Analyse de la phosphorylation *in vitro* de la β -tubuline par JNK

Nous avons utilisé des dimères de tubulines α/β purifiés de cerveau de porc, dans des conditions permettant ou non leur polymérisation. Ces essais ont été réalisés en ajoutant ou non au milieu réactionnel (contenant déjà la tubuline dans le tampon de l'enzyme et l'ATP nécessaire à la phosphorylation) des amorces de microtubules préalablement polymérisés *in vitro*, du GTP, et l'enzyme (GST-JNK1 α 1 recombinante et active). Les différents mélanges réactionnels sont incubés pendant 30 ou 60 minutes, à 37°C ou 30°C. Les échantillons sont ensuite analysés par Western-blot avec les anticorps anti-P-thréonine ou anti-P-sérine. Les mêmes échantillons sont également déposés sur un gel SDS-PAGE contenant du PhosTagTM.

A – Etude de la phosphorylation *in vitro* de la tubuline et détermination du/des site(s) de phosphorylation

Pour rappel, seule la β -tubuline présente deux sites consensus de phosphorylation pour JNK (Ser172 et Thr219, cf. **Figure 154**).

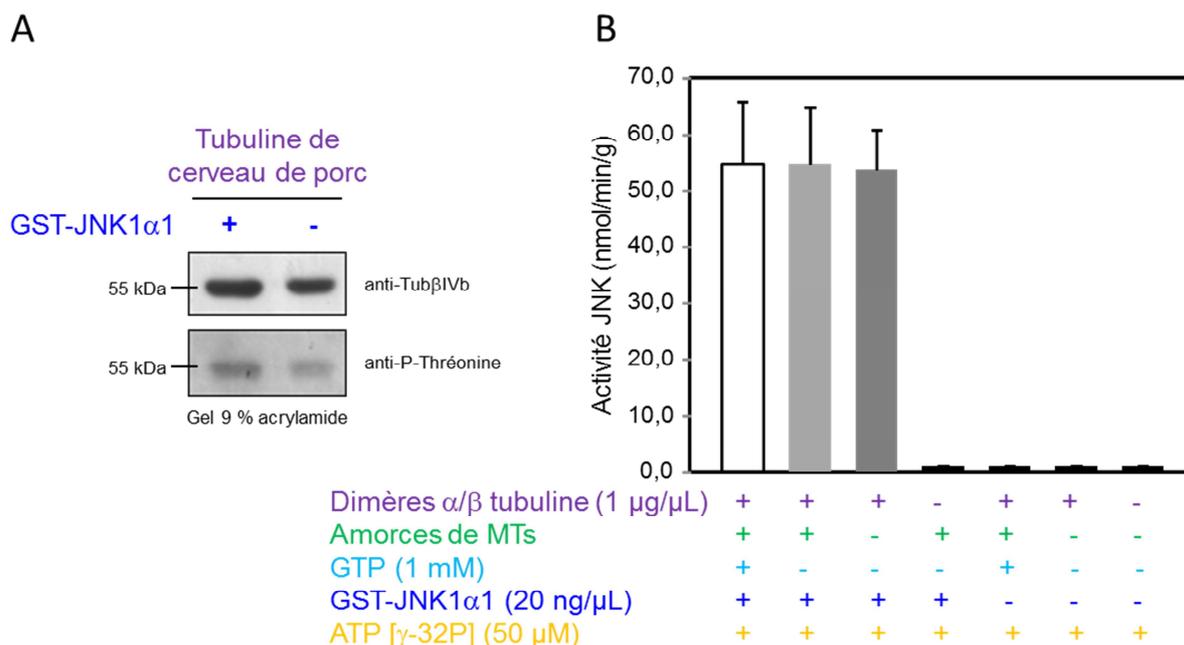


Figure 159 : Phosphorylation *in vitro* de la tubuline par JNK. (**A**) Détermination de la phosphorylation *in vitro* de la tubuline sur des résidus thréonine par Western-blots (gel 9 % acrylamide). Les Western-blots sont révélés avec les anticorps anti-Tub β IVb et anti-P-Thréonine. Contrôle de l'expérience de phosphorylation de la β -tubuline dans les cellules HeLa (cf. **Figure 158**). (**B**) Détermination de l'activité de JNK, reflétant la phosphorylation *in vitro* de la tubuline. Les dimères de tubuline sont incubés en présence ou non de JNK (kinase recombinante active : GST-JNK1 α 1), de GTP ou d'amorces et dans tous les cas d'ATP [γ -32P]. (Moyenne +/- écart-type, n = 2).

Les premières études ont été menées en mesurant l'activité de JNK sur la tubuline en présence de [γ -32P]-ATP. Ces expériences ont permis de mesurer l'incorporation de phosphate γ -

32 dans la tubuline et donc la phosphorylation *in vitro* de la protéine. Ces résultats nous montrent que la tubuline est phosphorylée uniquement en présence de JNK et indépendamment de l'ajout de GTP ou d'amorces, sous-entendu dans des conditions permettant ou non la polymérisation de la tubuline. Ainsi, JNK peut phosphoryler la tubuline *in vitro*. Cette phosphorylation semble se faire sur la tubuline libre, sans que celle-ci ait besoin de polymériser (cf. **Figure 159**). En présence uniquement d'amorce, l'activité de JNK n'augmente pas, soit car la concentration en tubuline n'est pas suffisamment importante pour pouvoir observer un changement dans le niveau de phosphorylation, soit car JNK ne peut pas phosphoryler la tubuline sous forme de polymère (cf. **Figure 159**).

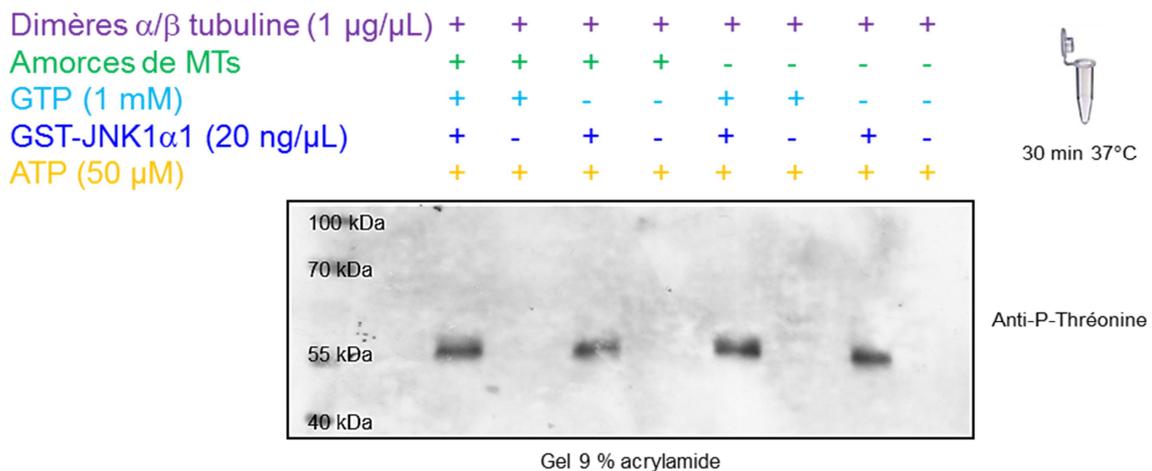


Figure 160 : Étude de la phosphorylation des dimères α/β -tubuline par JNK sur des résidus thréonine dans un système reconstitué *in vitro*. Western-blot (gel 9 % acrylamide) avec les échantillons obtenus après phosphorylation *in vitro* par JNK (kinase recombinante active : GST-JNK1 α 1) de la tubuline et révélé avec l'anticorps anti-P-thréonine.

La phosphorylation de la tubuline par JNK a ensuite été étudiée dans les mêmes conditions, mais en révélant la tubuline phosphorylée, sur des thréonines ou sur des sérines, par Western-blot. En étudiant tout d'abord, la phosphorylation des thréonines (cf. **Figure 160**), il semble clair, qu'*in vitro*, une ou plusieurs thréonines de la tubuline sont phosphorylées par JNK1 α 1, comme en témoigne la présence de bandes proches de 55 kDa dans toutes les conditions où JNK et l'ATP sont présents (cf. **Figure 160**). Comme précédemment, cette phosphorylation ne dépend pas de l'état de polymérisation de la tubuline. En effet, lorsque nous ajoutons les amorces de MTs et/ou le GTP, la phosphorylation ne change pas (cf. **Figure 160**). Comme la séquence peptidique de l' α -tubuline ne contenant pas de sites consensus de phosphorylation pour JNK et que la séquence de la β -tubuline n'en possède qu'un seul, la Thr219, nous pensons que la thréonine phosphorylée par JNK est donc la Thr219 de la β -tubuline.

Pour vérifier que seule la Thr219 était phosphorylée *in vitro* par JNK, nous avons aussi analysé la phosphorylation *in vitro* de la tubuline sur des résidus sérine.

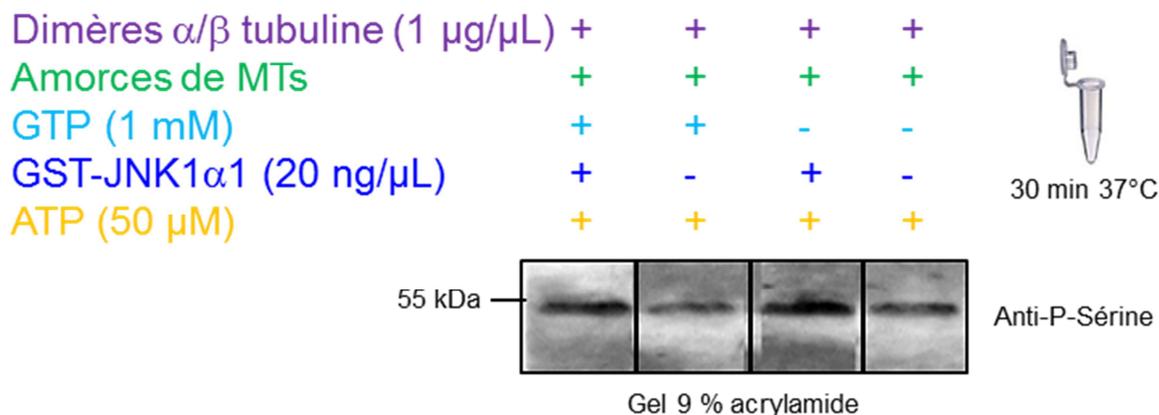


Figure 161 : Étude de la phosphorylation des dimères α/β -tubuline par JNK sur des résidus sérine dans un système reconstitué *in vitro*. Western-blot (gel 9 % acrylamide) avec les échantillons de phosphorylation *in vitro* par JNK (GST-JNK1 α 1) de la tubuline de cerveau de porc et révéleé avec l'anticorps anti-P-sérine.

Sur la figure 161, nous observons que les dimères α/β de tubulines ont un niveau basal de phosphorylation sur des résidus sérine. Ce niveau augmente légèrement en présence de JNK, mais de façon beaucoup moins importante que ce qui a précédemment été observé sur les thréonines. Ainsi, il est possible qu'*in vitro* JNK induise une légère augmentation de la phosphorylation de la sérine 172 de la β -tubuline.

La figure 161, nous permet également d'observer qu'en absence de JNK, il y a une bande autour de 55 kDa, correspondant à la tubuline. Cela suggère que les bandes autour de 55 kDa observées à chaque fois en présence de JNK dans le Western-blot précédent (cf. **Figure 160**), ne correspond pas un contaminant de la préparation de la JNK recombinante active.

Les mêmes échantillons que ceux utilisés pour la figure 160 ont ensuite été déposés sur un gel SDS-PAGE contenant 50 μM de PhosTagTM, puis révéleés par un anticorps anti-tub β IVb, afin d'observer un retard de migration de la β -tubuline dû à sa phosphorylation.

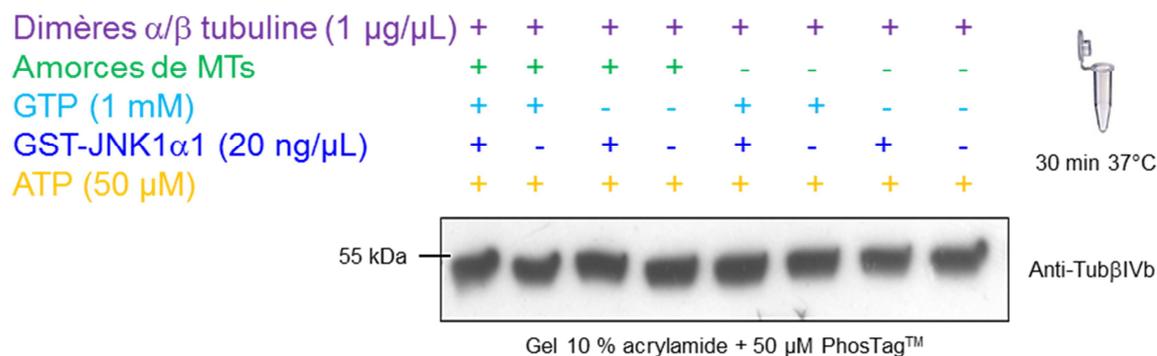


Figure 162 : Observation de la phosphorylation des dimères α/β -tubuline par JNK dans un système reconstitué *in vitro*. Western-blot (gel 10 % acrylamide + 50 μM PhosTagTM) avec les échantillons de phosphorylation *in vitro* par JNK de la tubuline et révéleé avec l'anticorps anti-Tub β IVb.

La figure 162, montre qu'aucun retard de migration dû à des phosphorylations ne peut être clairement distingué malgré l'ajout de PhosTagTM dans le gel SDS-PAGE. Ainsi, nous supposons que le PhosTagTM n'a pas reconnu la β -tubuline phosphorylée. Cette hypothèse pourrait expliquer les résultats de la figure 155, dans lesquels l'activation de JNK dans les cellules HeLa n'avait pas d'effet sur la migration de la β -tubuline. (cf. Figure 155).

B - Caractérisation du site identifié comme phosphorylé *in vitro* par JNK

Les résultats précédents, suggèrent que la β -tubuline pourrait être phosphorylée *in vitro* sur la Thr219. Pour vérifier que c'est bien ce résidu thréonine qui est phosphorylé, nous avons muté la Thr219 en alanine (Ala) et réanalysé la phosphorylation *in vitro* de la β -tubuline. Nous attendons donc une disparition de la phosphorylation de la Thr219 dans ces conditions.

Nous avons surexprimé la Tub β IVb fusionné à un tag GFP. Comme précédemment, la Thr186 de la GFP a été mutée en Ala car nous avons découvert que ce site est phosphorylé par JNK (données non montrés). L'expérience de phosphorylation *in vitro* a été renouvelée sur la β -tubuline immunoprécipitée par GFP-Trap®.

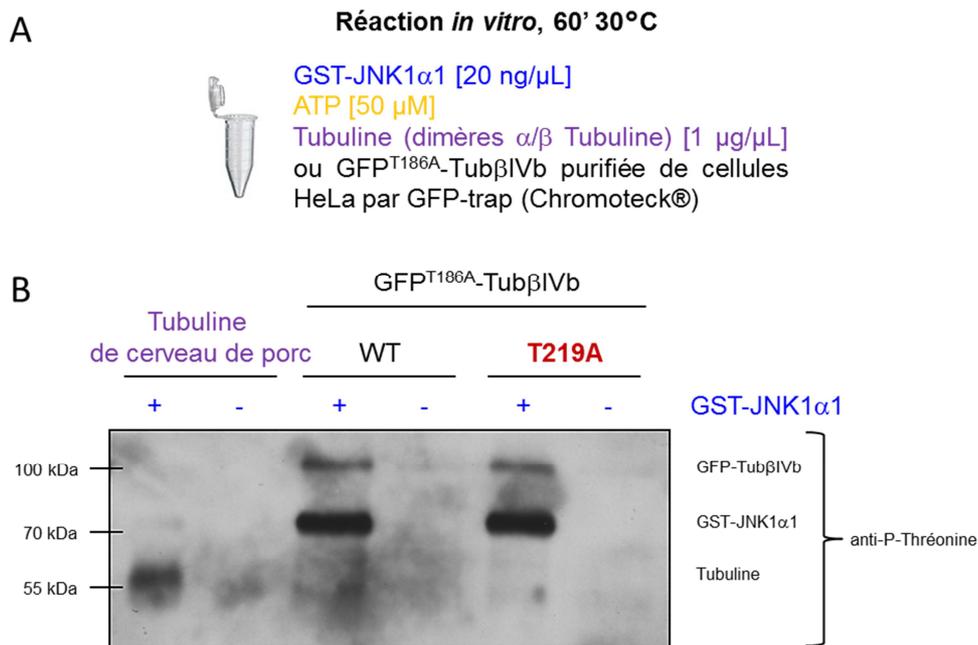


Figure 163 : Détermination du/des site(s) de phosphorylation par JNK dans la β -tubuline. (A) Protocole simplifié pour réaliser la phosphorylation *in vitro* des dimères α/β -tubuline par JNK. Les conditions utilisées sont un peu différentes de celles des précédentes expériences. (B) Western-blot (gel 9 % acrylamide) sur les échantillons de phosphorylation *in vitro* par JNK (GST-JNK1 α 1) de la tubuline de cerveau de porc, ou des constructions GFP^{T186A}-Tub β IVb^{WT} ou ^{T219A}. Le Western-blot est révéler avec l'anticorps anti-P-thréonine.

Les conditions de phosphorylation *in vitro* sont un peu différentes de celles utilisées lors des expériences précédentes. Les échantillons ont été incubés 60 minutes à 30°C (cf. Figure 163-A), de façon similaire au protocole de phosphorylation *in vitro* de CLIP-170. La phosphorylation de tubuline de cerveau de porc sert de contrôle positif. Les constructions GFP^{T186A}-Tub- β IVb^{WT}

et T219A ont été purifiées par GFP-Trap® après surexpression de ces dernières dans les cellules HeLa.

Sur le Western-blot ci-dessus (cf. **Figure 163-B**), en présence de JNK la tubuline de cerveau de porc est phosphorylée sur des résidus thréonine. Avec les constructions WT et T219A de la Tub β IVb, nous observons des bandes uniquement dans les puits où de la JNK recombinante active a été ajoutée. La kinase est visualisable sous la forme d'une bande intense (à environ 70 kDa), correspondant à la Thr183 phosphorylée de la JNK active.

Cette première observation confirme que la GFP^{T186A}-Tub β IVb est phosphorylée *in vitro* sur des résidus thréonine. Cependant, la T219 ne semble pas être la cible de JNK car le mutant T219A est également phosphorylé.

L'ensemble de ces données, indique que la β -tubuline est phosphorylée *in vitro* par JNK, mais sur un ou des résidus thréonine, différents de la Thr219, donc sur un ou des site(s) non consensus.

III – Étude de l'interaction de la β -tubuline avec JNK

Nous avons ensuite étudié l'interaction de la β -tubuline avec JNK par co-immunoprécipitation. La GFP^{T186A}-Tub β IVb surexprimée dans des cellules HeLa a ensuite été immunoprécipitée par GFP-Trap®. Le témoin réalisé en parallèle a consisté à surexprimer puis à immunoprécipiter l'eGFP seule. Lors de cette expérience, l'activité de JNK a été induite par l'anisomycine ou par l'expression de JNK recombinante active (Flag-MKK7-JNK1 α 1^{WT}).

Dans un premier temps, nous avons vérifié par Western-blot que la GFP^{T186A}-Tub β IVb et l'eGFP ont bien été immunoprécipitées et sont bien retrouvées dans la fraction « Bound ».

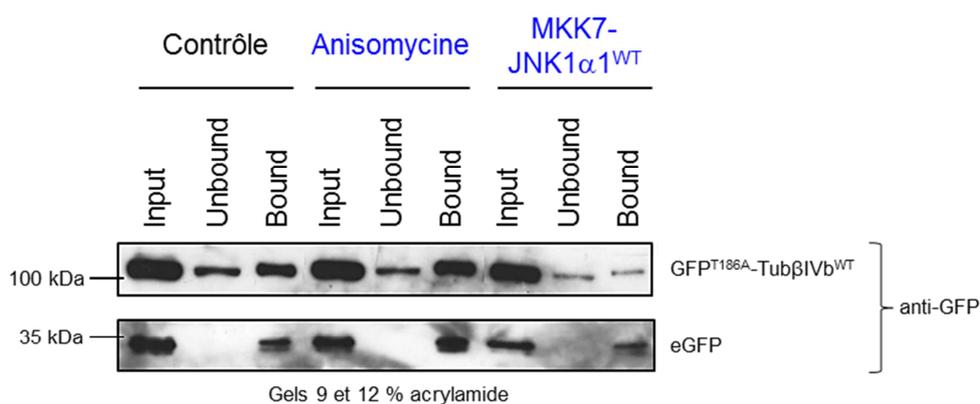


Figure 164 : Contrôle de l'immunoprécipitation des transgènes. Western-blots (gels 9 et 12 % acrylamide) d'extraits de GFP-Trap®. Surexpression et immunoprécipitation de GFP^{T186A}-Tub β IVb^{WT} et eGFP. Activation ou non de JNK via deux activateurs (anisomycine et Flag-MKK7-JNK1 α 1^{WT}). Input = lysat cellulaire de départ, Unbound = lysat cellulaire ne s'étant pas accroché aux billes, Bound = lysat cellulaire liés aux billes. Les mêmes volumes des trois lysats sont déposés.

Le Western-blot ci-dessus (cf. **Figure 164**) montre que la protéine (GFP^{T186A}-TubβIVb^{WT}) est retrouvée dans le lysat total (« Input »), un peu dans la fraction exclue (« Unbound ») et principalement dans la fraction précipitée (« Bound »). Ceci est vrai aussi pour l'eGFP. Il est à noter cependant que, lorsque la β-tubuline est co-transfectée avec Flag-MKK7-JNK1α1^{WT}, la quantité de β-tubuline précipitée est plus faible que chez le témoin ou après traitement par l'anisomycine, mais reste facilement détectable.

Ainsi, ces Western-blots montrent que les protéines d'intérêts (GFP^{T186A}-TubβIVb^{WT} et eGFP) sont bien exprimées et immunoprécipitées.

Nous avons ensuite cherché une interaction potentielle entre JNK et la β-tubuline et donc analysé si la P-JNK co-immunoprécipite avec la GFP^{T186A}-TubβIVb^{WT} et/ou l'eGFP.

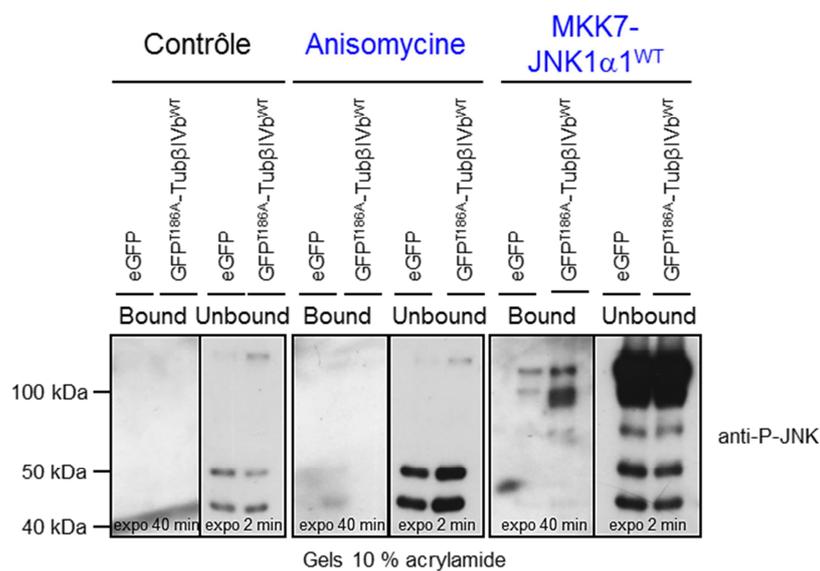


Figure 165 : Étude de l'interaction entre JNK et la β-tubuline. Western-blots (gels 10 % acrylamide) d'extraits de GFP-Trap® (Bound et Unbound). Ce sont les mêmes extraits que précédemment (cf. **Figure 164**) qui sont déposés. Environ vingt fois plus de « Bound » est déposé par rapport au Unbound pour chaque condition.

Sur les Western-blots ci-dessus (cf. **Figure 165**), nous pouvons voir que les P-JNKs endogènes (bandes entre 40 et 50 kDa) sont révélées dans les fractions « Unbound » dans les trois conditions. De plus, conformément aux effets attendus dans les conditions d'activation de JNK, les P-JNKs sont plus abondantes que dans le contrôle. Ce dernier présente des JNKs endogènes phosphorylées détectables, indiquant une activation basale de JNK dans les cellules HeLa. La protéine chimérique Flag-MKK7-JNK1α1^{WT} phosphorylée (bandes autour de 100 kDa) est bien visible lorsqu'elle est co-transfectée avec GFP^{T186A}-TubβIVb^{WT} ou eGFP.

Après immunoprécipitation dans les conditions contrôle ou après activation, les P-JNK endogènes ne sont pas retrouvées dans les échantillons « Bound », ce qui montre que les P-JNKs endogènes ne co-immunoprécipitent pas avec la GFP^{T186A}-TubβIVb^{WT} ou avec l'eGFP. En revanche, la construction constitutivement active de JNK (Flag-MKK7-JNK1α1^{WT}) co-

immunoprécipite légèrement avec la GFP^{T186A}-Tub β IVb^{WT}. Ce résultat pourrait s'expliquer par la grande quantité de Flag-MKK7-JNK1 α 1^{WT} présente dans l'échantillon et une interaction non spécifique de la protéine avec les billes lors du GFP-Trap®. Cependant, la faible quantité de Flag-MKK7-JNK1 α 1^{WT} retrouvé lors de la précipitation avec l'eGFP seule, semble bien indiquer une association spécifique entre la β -tubuline et Flag-MKK7-JNK1 α 1^{WT}.

Ces résultats suggèrent deux possibilités : a) c'est MKK7 qui interagit avec la tubuline, ou b) l'interaction avec la P-JNK aurait lieu au moment de l'activation de JNK, avec les complexes JIP/MAP3K/MAP2K/JNK et non une fois que la P-JNK est libérée de ces complexes. Dans les deux cas, ce résultat serait en accord avec le fait que les MAPKs s'associent avec les MTs via le moteur moléculaire, kinésine (**Reszka et al., 1995**). Plus spécifiquement, il a été décrit que JNK et ses MAP kinase-kinases activatrices sont recrutées sur les MTs via la complexe JIP/Kinésine-1 (pour revue, **Daire and Poüs, 2011**).

IV - Effet de la phosphorylation médiée par JNK sur la localisation cellulaire de la β -tubuline

Même si la Thr219 n'a pas pu être confirmée comme site de phosphorylation de la β -tubuline par JNK, nous avons cherché en parallèle à savoir si la phosphorylation de cette thréonine avait des effets sur la localisation de la β -tubuline. Pour cela, nous avons surexprimé les tubulines sauvage GFP-Tub β IVb^{WT}, non phosphorylable (T219A), ou phospho-mimétique (T219E). Il est important de noter que ces expériences ont été réalisées alors que le tag GFP de ces constructions n'était pas encore muté en Ala sur la Thr186. Ces plasmides ont été co-transfectés avec un vecteur codant la mCherry- α -tubuline dans des cellules RPE1 pour améliorer l'incorporation de la β -tubuline dans les MTs. Le réseau microtubulaire a été examiné en microscopie à fluorescence.

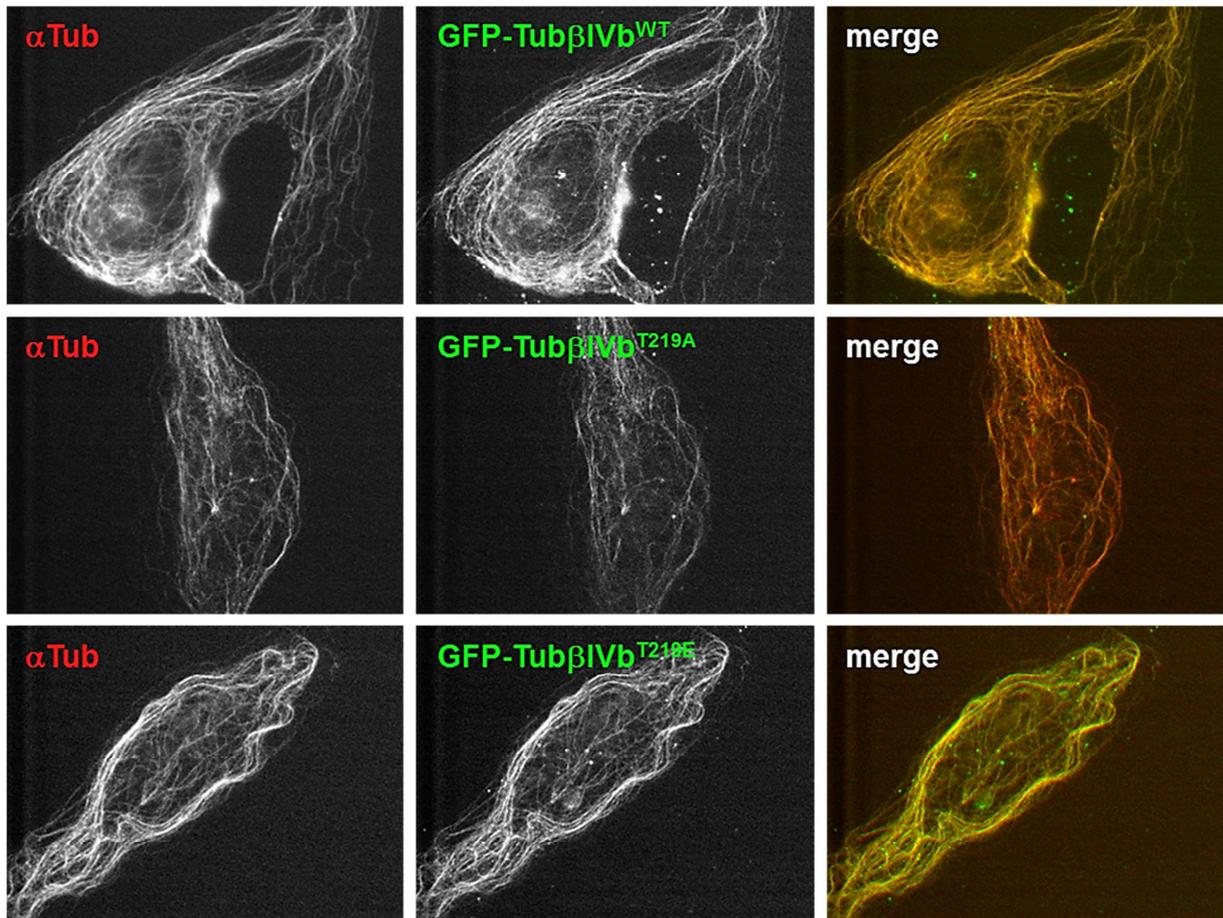


Figure 166 : Analyse de l'effet de la phosphorylation de la β -tubuline sur la Thr219 au niveau de l'organisation générale du réseau microtubulaire. Le réseau des MTs est observé dans des cellules RPE1 après co-transfection 1:1 de mCherry- α -tubuline et de GFP-Tub β IVb^{WT}, ^{T219A} ou ^{T219E}. Les images sont acquises après perméabilisation (PEM-Triton 0,1% 3 minutes) et fixation (méthanol, 5 minutes à -20°C).

En première analyse, la tubuline β IVb semble s'incorporer dans les MTs de la même façon que l' α -tubuline, indépendamment de la mutation de sa Thr219. Comme attendu, les deux tubulines α - et β - co-localisent, ce qui se traduit par une couleur jaune-orangée du réseau microtubulaire (cf. **Figure 166**), même s'il semble que l'intensité relative de la β -tubuline soit légèrement plus faible avec la GFP-Tub β IVb^{T219A}.

Cette expérience (n=1) nous permet de montrer que la phosphorylation de la Thr219 ne semble pas avoir d'influence sur l'incorporation de la β -tubuline dans les MTs, contrairement à ce qui a été décrit en mitose pour la phosphorylation de la Ser172 de la β -tubuline qui altère l'incorporation de la tubuline dans les MTs en croissance, probablement à cause de l'inhibition de la liaison du GTP/GDP et du turnover du groupe phosphate (**Fourest-Lieuvin et al., 2006**). En revanche, le mutant phospho-mimétique semble provoquer la formation de nombreuses courbures dans les MTs, en particulier quand ces derniers s'assemblent en faisceaux. Cet effet pourrait résulter d'un changement de l'angle formé par les dimères de tubuline d'un même protofilament dans les MTs car la Thr219 fait face au résidu Lys326 porté par l' α -tubuline du dimère suivant

(cf. **Figure 167**). La création d'une telle liaison pourrait stabiliser les MTs en renforçant les interactions longitudinales dans les protofilaments.

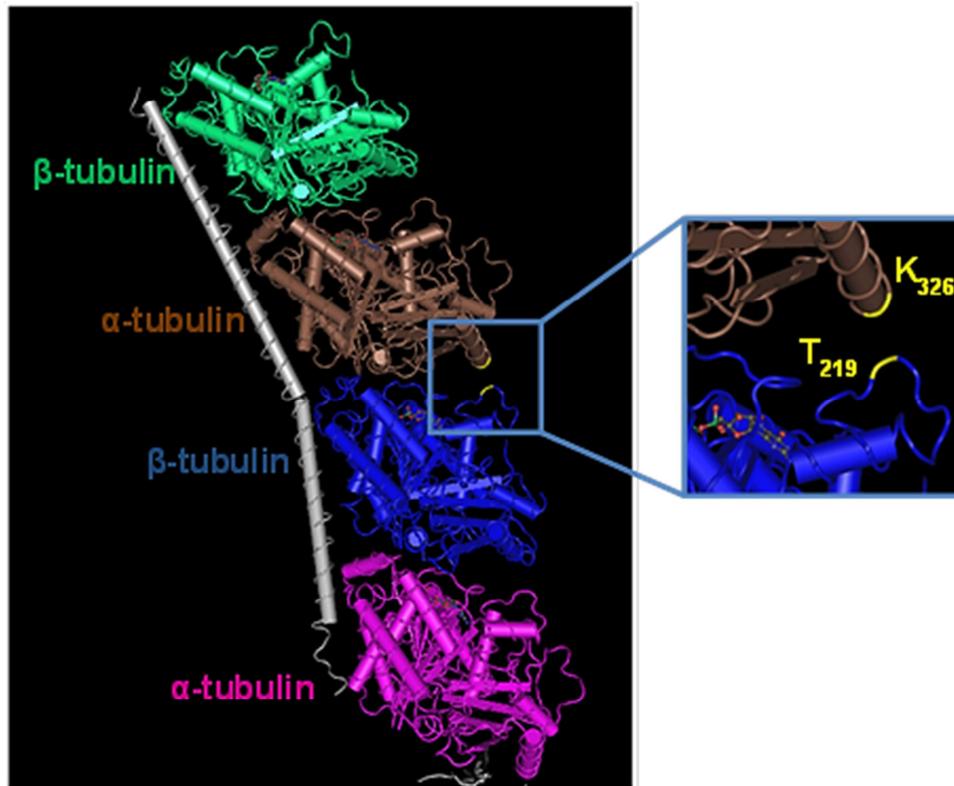


Figure 167 : Structure de la tubuline (deux dimères liés à la protéine Rb3, structure 3N2K). La Thr219 de la sous-unité β (bleue) et la Lys326 de la sous-unité α (marron) sont surlignées en jaune.

V - Effet de la phosphorylation de la β -tubuline médiée par JNK sur la dynamique des MTs

L'hypothèse d'un renforcement de la stabilité des MTs contenant la Tub β IVb^{T219E} nous a incités à explorer l'impact de la phosphorylation de la Thr219 sur la dynamique des MTs. Pour cela, nous avons déterminé les quatre paramètres principaux de l'instabilité dynamique (les vitesses de polymérisation et dépolymérisation, ainsi que les fréquences de sauvetage et catastrophe) dans des cellules épithéliales (RPE1) (cf. **Figures 168 et 169**).

Expérimentalement, nous avons suivi individuellement chaque MT dans des cellules RPE1 surexprimant mCherry- α tubuline et GFP^{T186A}-Tub β IVb^{WT, T219A ou T219E}. Lors de cette expérience la Thr186 du tag GFP de la β -tubuline a été mutée en Ala.

Dans un premier temps, les quatre paramètres de la dynamique des MTs ont été représentés sur un graphique en diamant. Ce graphique (cf. **Figure 168**) suggère que la

dynamique est accélérée avec la construction phospho-mimétique (T219E), par rapport au témoin (WT). En effet, la vitesse de polymérisation moyenne est environ cinq fois plus grande avec la β -tubuline^{T219E} par rapport à la β -tubuline^{WT}. Les autres paramètres sont également augmentés d'environ 1,5 à 3 fois par rapport au témoin. Lors de l'utilisation de la construction non-phosphorylable (T219A), la dynamique semble aussi modifiée, mais affecte seulement la fréquence de sauvetage et la vitesse de polymérisation (augmentées d'environ 2,5 fois).

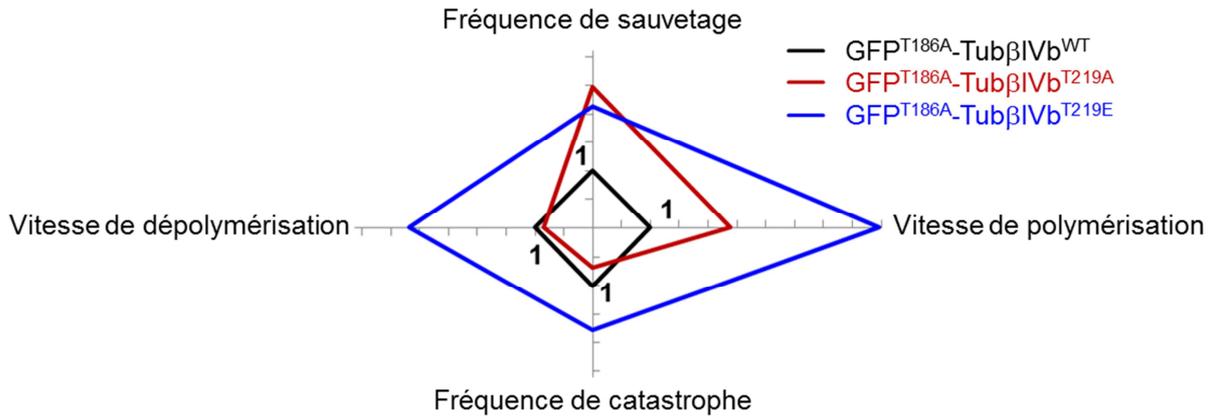


Figure 168 : Détermination du comportement dynamique des microtubules en fonction de l'état de phosphorylation de la β -tubuline. Représentation sous forme de diamond graphe des quatre paramètres de la dynamique des MTs, à savoir les fréquences de sauvetage et catastrophe (en s^{-1}), ainsi que les vitesses de polymérisation et dépolymérisation (en $\mu m/s$). Ces paramètres sont mesurés dans des cellules RPE1 co-transfectées avec les ADNs mCherry- α -tubuline et la GFP^{T186A}-Tub β IVb wild-type (WT), ou non-phosphorylable (T219A), ou phospho-mimétique (T219E). Les données avec la construction WT de la β -tubuline sont normalisées à 1, afin de permettre une comparaison globale plus facile. (n = 1 ; WT : 14 MTs et 7 cellules ; T219A : 2 MTs et 1 cellule ; T219E : 18 MTs et 13 cellules).

Malgré les écarts des moyennes observées, l'analyse statistique (Mann-Whitney) de ces données ne montre cependant pas de différence significative entre les tubulines mutées et sauvage (cf. **Figure 169**). Les effets semblent masqués du fait de la dispersion importante des données et du nombre encore insuffisant de MTs analysés.

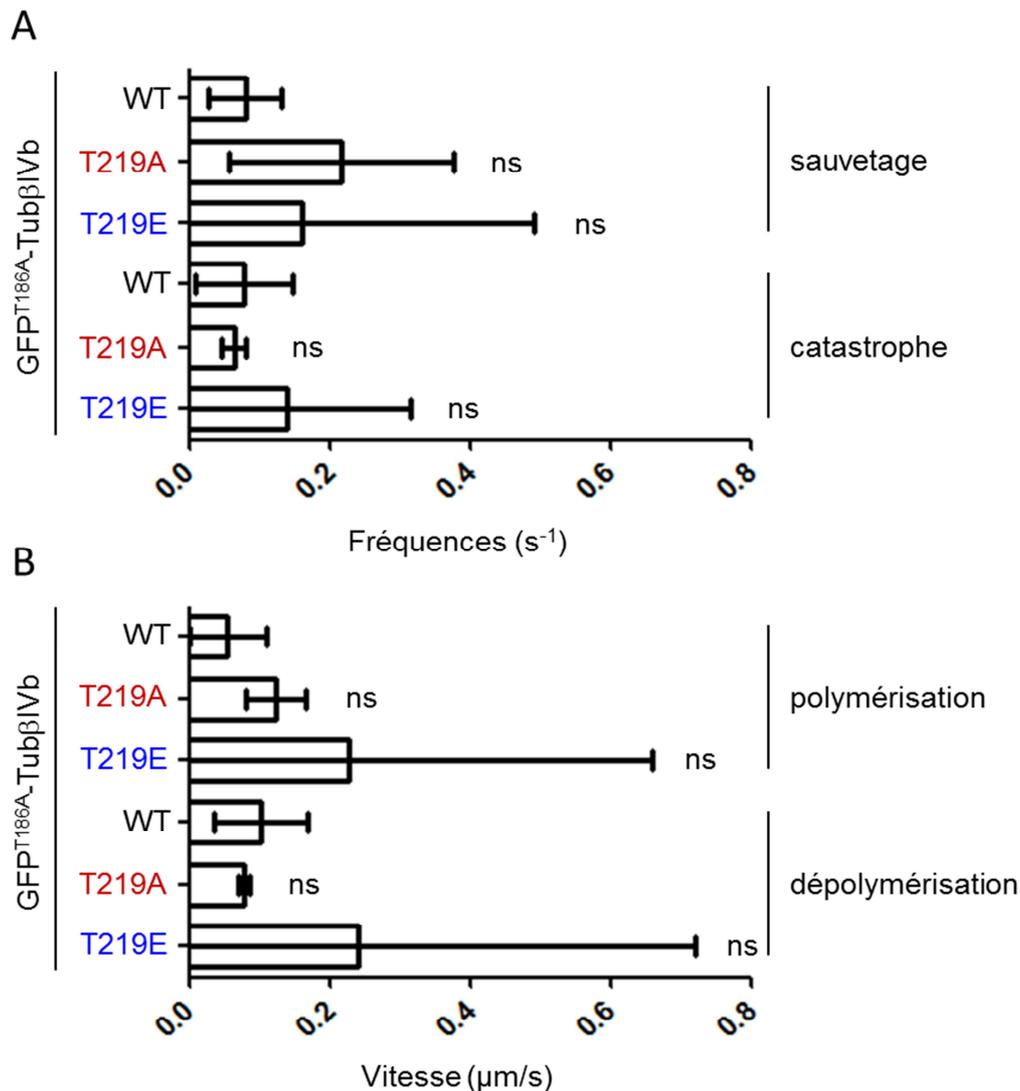


Figure 169 : Détermination du comportement dynamique des microtubules en fonction de l'état de phosphorylation de la β -tubuline. Représentation sous forme d'histogramme (moyenne \pm écart-type) (**A**) des fréquences de sauvetage et de catastrophe (en s^{-1}), ainsi que (**B**) des vitesses de polymérisation et de dépolymérisation (en $\mu m/s$). Ces quatre paramètres mesurés dans des cellules RPE1 co-transfectées avec les ADNs mCherry- α -tubuline et la GFP^{T186A}-Tub β IVb wild-type (WT), ou non-phosphorylable (T219A), ou phospho-mimétique (T219E). (n = 1 ; WT : 14 MTs et 7 cellules ; T219A : 2 MTs et 1 cellule ; T219E : 18 MTs et 13 cellules). Statistique : test de Mann-Whitney, ns = non significatif.

Si la tendance observée avec l'inclusion de nouvelles données devait se confirmer, la phosphorylation de la β -tubuline sur la Thr219 pourrait accroître la dynamique des MTs en affectant surtout les vitesses de polymérisation et dépolymérisation des MTs. Un tel phénotype serait similaire à celui observé en réponse à une activation de JNK dans les cellules épithéliales (Daire *et al.*, 2009). L'effet de courbure des MTs pourrait alors être dû à un effet architectural sur la paroi microtubulaire et non à leur stabilisation.

Discussion et perspectives pour la β -tubuline

Nous avons regardé si la tubuline et plus particulièrement la sous-unité β est un nouveau substrat de JNK, pouvant expliquer les effets de JNK sur la dynamique des MTs dans les cellules épithéliales et notamment l'augmentation de la vitesse de polymérisation des MTs.

Dans un premier temps, nous avons cherché à caractériser le ou les site(s) de phosphorylation par JNK dans la β -tubuline, l' α -tubuline ne présentant aucun site consensus de phosphorylation par JNK (SP ou TP).

Sur les deux sites potentiels présents dans la séquence de la β -tubuline (Ser172 et Thr219), la Ser172 était déjà caractérisée dans la littérature (**Fourest-Lieuvin *et al.*, 2006**) comme phosphorylée par une autre kinase (Cdk1). Par ailleurs, les expériences en présence d'ATP radioactif ont montré que JNK induit une incorporation de phosphate γ -32 dans les dimères de tubuline, reflétant la phosphorylation *in vitro* de la tubuline. Nos autres expériences *in vitro*, ont montré à plusieurs reprises que la β -tubuline est phosphorylée sur des résidus thréonine et non sérine. L'ensemble de ces données *in vitro*, permettent de confirmer que c'est bien la tubuline qui est phosphorylée et que nous ne détectons pas une phosphoprotéine contaminante.

Ensuite, nous nous sommes plus particulièrement focalisés sur l'étude de la phosphorylation de la Thr219 de la β -tubuline. Sa mutation en Ala (non phosphorylable), n'a pas empêché la phosphorylation *in vitro* de la β -tubuline. Cette observation contradictoire pourrait être due aux conditions de phosphorylation *in vitro*. En effet, dans ces dernières, le système est « forcé » par la présence de fortes concentrations de JNK active pouvant peut-être induire la phosphorylation de la β -tubuline par JNK sur des sites non canoniques. Ainsi, de ces différentes expériences de phosphorylation *in vitro*, nous concluons que la β -tubuline est phosphorylée sur des résidus thréonine, mais pas (ou pas suffisamment) sur la Thr219 initialement supposée.

Parallèlement, la phosphorylation de la Thr219 de la β -tubuline pourrait impacter la dynamique des MTs, comme le suggèrent les tendances observées sur les vitesses de polymérisation et de dépolymérisation, ainsi que, sur les fréquences de catastrophe et de sauvetage. La dispersion des résultats obtenus reste cependant trop élevée pour observer des modulations significatives de ces paramètres.

Une limite plausible des approches entreprises dans ces études de phosphorylation est un seuil de détection élevé et une probable sensibilité insuffisante des méthodes employées. Ceci semble particulièrement vrai dans les études de phosphorylation dans les cellules HeLa. Cela suggère que si une phosphorylation de la β -tubuline par JNK a lieu dans les cellules, celle-ci est faible, rendant sa détection très difficile malgré la stimulation de la kinase. De plus, les JNKs sont décrites comme des kinases peu spécifiques envers leurs substrats. Cela vient du fait que leurs sites consensus de phosphorylation (SP ou TP) sont retrouvés dans un grand nombre de

protéines, mais aussi que les JNKs peuvent phosphoryler d'autres sites (SA ; TA ; SS ; TS ; ST ; TT ; SG et TG) dans lesquels c'est une Thr ou Ser (acide aminé souligné) qui est phosphorylé, mais ces sites sont moins afin que les sites SP/TP (**Zeke et al., 2016**). Cela suggère qu'elles peuvent phosphoryler certaines protéines, étant des substrats moins spécifiques des JNKs sur des sites canoniques ou non canoniques des kinases. Cela pourrait être le cas pour les essais de phosphorylation *in vitro* de la β -tubuline, expliquant que cette phosphorylation n'a pas pu être retrouvée dans les cellules.

En continuité de ce travail, il sera intéressant de continuer les analyses de phosphorylation *in vitro*, notamment en caractérisant la ou les thréonine(s) non consensus sur lesquelles la β -tubuline est phosphorylée *in vitro* par JNK. D'après le site *PhosphoNet.ca*, trois autres thréonines n'appartenant pas à une séquence TP pourraient être des sites potentiels de phosphorylation par JNK sur la β -tubuline. Il s'agit de la Thr72, la Thr166 et la Thr274 (cf. **Annexe V**). Parmi ces sites, la Thr274 est un site TS correspondant à un site potentiellement phosphorylable par les JNKs (**Zeke et al., 2016**).

Dans le but de caractériser ces sites, il faudrait les muter un par un en alanine et observer avec quelle(s) mutation(s) la phosphorylation *in vitro* de la β -tubuline disparaît. Il faudrait ensuite améliorer la sensibilité de détection de la phospho-tubuline *in vivo* en essayant d'enrichir une immunoprécipitation de tubuline en phosphoprotéines et combiner éventuellement cette opération avec une phosphorylation par de l'ATP³², ou avec un couplage en spectrométrie de masse. Une fois la phosphorylation confirmée et son site établi, il faudra identifier si cette phosphorylation a lieu dans des cellules épithéliales humaines, en condition basale et de stress. Il conviendra de rechercher en priorité un effet sur les vitesses de polymérisation et dépolymérisation, en suivant par exemple des comètes EB3 dans des cellules exprimant les différents mutants des sites de phosphorylation.

Conclusion générale et perspective

La dynamique des MTs, résultant d'une alternance continue entre les phases de polymérisation et de dépolymérisation (**Mitchison and Kirschner, 1984b**), est indispensable au bon fonctionnement de diverses fonctions cellulaires régulées par les MTs. Cette instabilité microtubulaire est régulée *in vivo* par une grande variété de protéines (**Akhmanova and Steinmetz, 2010 ; Park et al., 2012 ; Akhmanova and Steinmetz, 2015**), dont CLIP-170, une protéine de la famille des +TIPs (**Perez et al., 1999**), qui est caractérisée comme un facteur majeur de sauvetage des MTs (**Komarova et al., 2002a**). Précédemment, au laboratoire, il a été montré que dans les cellules épithéliales en interphase, la kinase de stress JNK influence l'instabilité dynamique des MTs en augmentant à la fois la vitesse de polymérisation et la fréquence de sauvetage (**Daire et al., 2009**). Cependant, concernant le sauvetage des MTs, c'est-à-dire un événement de re-polymérisation ou pause après une phase de dépolymérisation, le mécanisme moléculaire contrôlant cette étape n'est pas bien défini. Par ailleurs, l'étude des vitesses de polymérisation des MTs est aussi un domaine de recherche important pour caractériser le phénomène d'instabilité dynamique. Il est donc apparu primordial de mieux connaître l'implication de CLIP-170 dans le sauvetage des MTs, mais aussi de la β -tubuline, un composant des MTs, dans le processus de polymérisation des MTs.

L'approche candidat utilisée dans cette thèse a permis d'identifier CLIP-170 comme un nouveau substrat de JNK dans les cellules épithéliales humaines en interphase et d'écartier la β -tubuline.

Pour résumer, nous avons montré au cours de cette thèse qu'en condition de stress activant JNK, le domaine H1 de CLIP-170 est directement phosphorylé sur au moins trois sites qui ont été caractérisés comme étant la Thr25, la Thr45 et la Ser147. Dans cette étude, deux sortes de stress qui activent JNK ont été utilisées, soit des stress courts (anisomycine, NaCl et UVC), soit des stress longs (avec Flag-MKK7-JNK1 α 1 et Flag-MKK7-JNK2 α 2). L'utilisation de ces deux stress a permis de montrer qu'en fonction de la durée d'activation de JNK, la spécificité envers les nouveaux sites identifiés ici est différente. Il est important de noter que ces nouveaux sites identifiés sont des sites consensus de phosphorylation pour JNK et que la Ser147 est le site le plus conservé dans diverses espèces et le seul phosphorylé en condition basale. De plus, pour la première fois, nous avons montré que chacune de ces phosphorylations influencent positivement l'activité de sauvetage de CLIP-170, sans affecter sa localisation cellulaire, suggérant qu'elles engendrent probablement une modification conformationnelle de la protéine afin de faciliter l'incorporation de dimères de tubuline dans les MTs. En accord avec l'hypothèse suggérée par **Daire et al., (2009)**, ces résultats démontrent que JNK et CLIP-170 coopèrent pour réguler la dynamique des MTs, en augmentant les fréquences de sauvetage. Cette étude permet donc d'affirmer que la voie de signalisation JNK/CLIP-170 est un régulateur majeur du sauvetage des MTs dans les cellules épithéliales en interphase.

Concernant la β -tubuline, nous avons montré que cette protéine est spécifiquement phosphorylée dans un système reconstitué *in vitro* par JNK. D'après la séquence peptidique de la β -tubuline, deux sites consensus de phosphorylation (SP ou TP) étaient envisageables, la Ser172 et la Thr219. Dans de ce travail de thèse, nous avons démontré que c'est une/des thréonine(s) dans la β -tubuline qui est/sont phosphorylée(s) *in vitro* de manière dépendante de JNK. Ainsi, nous avons plus particulièrement étudié la phosphorylation de la Thr219 de la β -tubuline par JNK. Cependant, nous n'avons pas réussi à retrouver cette phosphorylation dans les cellules HeLa et en utilisant une construction de la β -tubuline contenant la Thr219 mutée en alanine (acide aminé non phosphorylable), nous avons montré qu'*in vitro* ce n'est pas elle qui est phosphorylée par une JNK recombinante active. À ce jour, nous n'avons donc pas identifié la/les thréonine(s) phosphorylées par JNK aussi bien *in vitro* qu'*in vivo*. L'ensemble de ces résultats suggère donc que la β -tubuline ne semble pas être un substrat conventionnel de JNK dans les cellules épithéliales en interphase.

Faisant suite à tous ces travaux, une approche pertinente consisterait à réaliser un crible systématique dans les cellules épithéliales pour identifier d'autres MAPs cellulaires effectrices de JNK, pouvant notamment expliquer les effets de la kinase sur l'augmentation de la vitesse de polymérisation des MTs et éventuellement la fréquence de sauvetage. Pour cela, un crible systématique pourra être réalisé selon la technique décrite par **Allen et al., (2007)** (cf. **Annexe VI-A**). Plus précisément, nous utiliserons une kinase mutée au niveau de la poche de l'ATP pouvant intégrer de l'ATP γ S, appelée JNK1^{ML} car elle possède les mutations M108G et L168A. Nous avons déjà produit par mutagenèse dirigée le transgène correspondant à cette kinase et dans les cellules HeLa, nous avons montré que la protéine JNK1^{ML} est toujours capable de phosphoryler le domaine H1 de CLIP-170 avec de l'ATP cellulaire (cf. **Annexe VI-B**). Dans la suite du protocole, les substrats phosphorylés par JNK1^{ML} intégreront le phosphate- γ S et pourront être alkylés par le PNBM (*p-nitrobenzyl mésylate*) formant un groupement thiophosphate ester qui pourra être immunoprécipité. L'analyse des substrats ainsi immunoprécipités sera réalisée par spectrométrie de masse, en collaboration avec la plateforme SICaPs de l'I2BC.

Ce crible permettra d'identifier une grande diversité de substrats. Cependant, en lien avec les effets de JNK identifiés sur la dynamique des MTs (**Daire et al., 2009**), nous nous intéresserons aux protéines MAPs (*Microtubule-Associated Proteins*) qui peuvent expliquer l'augmentation de la vitesse de polymérisation et éventuellement des fréquences de sauvetage (cf. **Tableau 34**). Ainsi, les substrats envisageables sont des polymérases, des dépolymérases, d'autres facteurs de sauvetage, des protéines motrices et d'autres protéines ayant des domaines CAP-Gly (cf. **Tableau 34**). Nous avons déjà observé que plusieurs MAPs possèdent des sites consensus de phosphorylation pour JNK (sites SP ou TP) dans leurs séquences nucléotidiques (cf. **Tableau 34**).

Comme dans les neurones, plusieurs MAPs substrats de JNK sont connues, nous pouvons supposer que les substrats qui seront identifiés par ce crible pourront être des équivalents de ces MAPs neuronales substrats de JNK.

Classes protéiques	Substrats attendus	Nombre de sites SP/TP
Polymérasés	ch-TOG/XMAP215	9
	SLAIN2	25
	EB1	0
	APC	21
Dépolymérasés	MCAK	3
	Stathmines	2
Facteurs de sauvetage	CLASPs	16
	CLIP-115	7
Protéines motrices	Kinésine-1 : KHC et KLC	3 et 2
	Dynéine	25
	CLIP-115 p150 ^{Glued}	7
Autres protéines ayant un domaine CAP-Gly	(sous-unité de la dynactine)	13
	CYLD	8
	CLIPR-59	7

Tableau 34 : MAPs envisageables comme des nouveaux substrats de JNK ayant des effets sur la dynamique des microtubules, du fait de la présence de sites SP/TP consensus.

Concernant, les polymérasés, nous pouvons supposer que leur phosphorylation augmenterait leur activité en faveur de l'ajout de nouvelles sous-unités de tubuline dans les MTs. Celles-ci pourront ainsi expliquer les effets de JNK aussi bien sur la vitesse de polymérisation que sur la fréquence de sauvetage. Quant aux dépolymérasés, nous pouvons envisager le raisonnement inverse, c'est-à-dire que leur activité déstabilisatrice serait inhibée par phosphorylation. Parmi celles-ci, nous pensons aux stathmines, qui sont déjà décrites comme des substrats de JNK dans les cellules neuronales (**Tararuk et al., 2006** ; **Yip et al., 2014**), pour lesquelles les phosphorylations diminuent leur activité déstabilisatrice des MTs, en réduisant la séquestration des dimères de tubuline (**Machado et al., 2014**). Concernant les moteurs moléculaires, nous pensons notamment aux kinésines dépolymérisantes de la famille des kinésine-8 (KIF19), kinésine-13 (KIF2A, KIF2B, KI2C/MCAK) et kinésine-14 (Kar-3), qui enlève les sous-unités de tubuline des bouts (+) des MTs (**Sturgill and Ohi, 2013**). Par exemple, nous pouvons imaginer que la fonction déstabilisatrice de KIF2C/MCAK serait inhibée par sa phosphorylation par JNK, ce qui serait en faveur de la polymérisation des MTs. Nous pouvons également citer la kinésine-1 qui participe à l'instabilité dynamique, en favorisant l'élongation des MTs (**Daire and Poüs, 2011**), en transportant la protéine kinase JNK activée (**Daire et al., 2009**). Par ailleurs, la kinésine-1 est déjà connue comme un substrat de JNK (**Morfini et al., 2006**), dont la phosphorylation médiée par JNK diminue le transport axonal, en inhibant sa liaison avec les MTs.

Protein family	Molecular organization	Main functions	CAP-Gly-domain binding partners
CLIP170 Tip1p (<i>Sp</i>), Bik1p (<i>Sc</i>), D-CLIP-190 (<i>Dm</i>)		MT rescue and stabilization; targeting of dynein to MT ends; MT interaction with the cell cortex and kinetochores	MT, EB, p150 ^{glued}
CLIP115		MT rescue	MT, EB
CLIPR-59		Trafficking between endosomes and trans-Golgi network	Tubulin, MT?
CLIP4		n.k.	n.k.
Dynactin1 (p150^{glued}) Ssm4p (<i>Sp</i>), Nip100p (<i>Sc</i>), NudM (<i>An</i>)		Binding dynein to cargo; regulation of dynein processivity	MT, EB, CLIP170
CYLD dCYLD (<i>Dm</i>)		Deubiquitylation of Lys63-linked polyubiquitin chains; inhibition of NF-κB and JNK pathways	NEMO, MT
KIF13B (GAKIN) Khc-73 (<i>Dm</i>)		Transport of PIP ₃ -containing vesicles and tumour suppressor Dlg	n.k.

Key:									
CAP-Gly	Coiled coil	ZnF	ETF	Basic serine	ANK	Kinesin	UCH	E/P	PMT

Figure 170 : Protéines ayant un ou plusieurs domaine(s) CAP-Gly et leurs propriétés (d'après **Steinmetz and Akhmanova, 2008**).

Nous pouvons aussi envisager que d'autres protéines possédant un ou plusieurs domaine(s) CAP-Gly puissent être des substrats de JNK. Par exemple, CLIP-115, p150^{Glued} CLIPR-59 et CYLD possèdent chacun plusieurs sites consensus (SP/TP), suggérant qu'ils puissent être ciblés par JNK (cf. **Tableau 34**). De plus, dans la famille des CAP-Gly, CLIP-115 possède des régions riches en sérines près de ses domaines CAP-Gly (**Steinmetz and Akhmanova, 2008** ; cf. **Figure 170**). Ainsi, la phosphorylation de CLIP-115 par JNK pourra peut-être engendrer un rôle similaire à celui identifié pour CLIP-170 dans cette étude, à propos du sauvetage des MTs, en induisant un changement conformationnel qui serait en faveur de l'incorporation des dimères de tubuline dans le polymère. Le même raisonnement peut aussi être tenu pour p150^{Glued} et CLIPR-59, qui possèdent aussi des régions riches en sérines près de leur domaine CAP-Gly (cf. **Figure 170**).

Bibliographie

A

- Abe M.K.**, Kuo W.L., Hershenson M.B., Rosner M.R., **1999**. Extracellular signal-regulated kinase 7 (ERK7), a novel ERK with a C-terminal domain that regulates its activity, its cellular localization, and cell growth. *Mol. Cell. Biol.* **19**(2):1301-12.
- Abe M.K.**, Saelzler M.P., Espinosa R. 3rd., Kahle K.T., Hershenson M.B., Le Beau M.M., Rosner M.R., **2002**. ERK8, a new member of the mitogen-activated protein kinase family. *J. Biol. Chem.* **277**(19):16733-43.
- Adamíková L.**, Straube A., Schulz I., Steinberg G., **2004**. Calcium signaling is involved in dynein-dependent microtubule organization. *Mol. Biol. Cell.* **15**(4):1969-80.
- Adio S.**, Reth J., Bathe F., Woehlke G., **2006**. Review: regulation mechanisms of Kinesin-1. *J. Muscle Res. Cell Motil.* **27**(2):153-60.
- Aillaud C.**, Bosc C., Saoudi Y., Denarier E., Peris L., Sago L., Taulet N., Cieren A., Tort O., Magiera M.M., Janke C., Redeker V., Andrieux A., Moutin M.J., **2016**. Evidence for new C-terminally truncated variants of α - and β -tubulins. *Mol. Biol. Cell.* **27**(4):640-53.
- Akella J.S.**, Wloga D., Kim J., Starostina N.G., Lyons-Abbott S., Morrissette N.S., Dougan S.T., Kipreos E.T., Gaertig J., **2010**. MEC-17 is an alpha-tubulin acetyltransferase. *Nature.* **467**(7312):218-22.
- Akhmanova A.** and Hoogenraad C.C., **2005**. Microtubule plus-end-tracking proteins: mechanisms and functions. *Curr. Opin. Cell Biol.* **17**(1):47-54.
- Akhmanova A.**, and Hoogenraad C.C., **2015**. Microtubule minus-end-targeting proteins. *Curr. Biol.* **25**(4):R162-71.
- 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**(4):309-22.
- Akhmanova A.** and Steinmetz M.O., **2010**. Microtubule + TIPs at a glance. *J. Cell Sci.* **123**(Pt 20):3415-9.
- Akhmanova A.** and Steinmetz M.O., **2015**. Control of microtubule organization and dynamics: two ends in the limelight. *Nat. Rev. Mol. Cell Biol.* **16**(12):711-26.
- Akhmanova A.**, Hoogenraad C.C., Drabek K., Stepanova T., Dortland B., Verkerk T., Vermeulen W., Burgering B.M., De Zeeuw C.I., Grosveld F., Galjart N., **2001**. Clasps are CLIP-115 and -170 associating proteins involved in the regional regulation of microtubule dynamics in motile fibroblasts. *Cell.* **104**(6):923-35.
- Akhmanova A.**, Mausset-Bonnefont A.L., van Cappellen W., Keijzer N., Hoogenraad C.C., Stepanova T., Drabek K., van der Wees J., Mommaas M., Onderwater J., van der Meulen H., Tanenbaum M.E., Medema R.H., Hooberbrugge J., Vreeburg J., Uringa E.J., Grootegoed J.A., Grosveld F., Galjart N., **2005**. The microtubule plus-end-tracking protein CLIP-170 associates with the spermatid manchette and is essential for spermatogenesis. *Genes Dev.* **19**(20):2501-15.
- Al-Bassam J.** and Chang F., **2011**. Regulation of microtubule dynamics by TOG-domain proteins XMAP215/Dis1 and CLASP. *Trends Cell Biol.* **21**(10):604-14.
- Al-Bassam J.**, Kim H., Brouhard G., van Oijen A., Harrison S.C., Chang F., **2010**. CLASP promotes microtubule rescue by recruiting tubulin dimers to the microtubule. *Dev. Cell.* **17**(2):245-58.

- Al-Bassam J.**, van Breugel M., Harrison S.C., Hyman A., **2006**. Stu2p binds tubulin and undergoes an open-to-closed conformational change. *J. Cell Biol.* 27;**172**(7):1009-22.
- Alberts B.**, Johnson A., Lewis J., Raff M., Roberts K., and Walter P., **2011**. Biologie moléculaire de la cellule, cinquième édition. *Médecine Sciences Publications Lavoisier*. ISBN : 978-2-257-00096-5.
- Alessi D.R.**, Cuenda A., Cohen P., Dudley D.T., Saltiel A.R., **1995**. PD 098059 is a specific inhibitor of the activation of mitogen-activated protein kinase kinase in vitro and in vivo. *J. Biol. Chem.* 17;**270**(46):27489-94.
- Alfaro-Aco R.** and Petry S., **2015**. Building the microtubule cytoskeleton piece by piece. *J. Biol. Chem.* 10;**290**(28):17154-62.
- Allen J.J.**, Li M., Brinkworth C.S., Paulson J.L., Wang D., Hübner A., Chou W.H., Davis R.J., Burlingame A.L., Messing R.O., Katayama C.D., Hedrick S.M., Shokat K.M., **2007**. A semisynthetic epitope for kinase substrates. *Nat. Methods.* 4(6):511-6.
- Alli E.**, Bash-Babula J., Yang J.M., Hait W.N., **2002**. Effect of stathmin on the sensitivity to antimicrotubule drugs in human breast cancer. *Cancer Res.* 1;**62**(23):6864-9.
- Alonso A.**, D'Silva S., Rahman M., Meluh P.B., Keeling J., Meednu N., Hoops H.J., Miller R.K., **2012**. The yeast homologue of the microtubule-associated protein Lis1 interacts with the sumoylation machinery and a SUMO-targeted ubiquitin ligase. *Mol. Biol. Cell.* 23(23):4552-66.
- Alushin G.M.**, Lander G.C., Kellogg E.H., Zhang R., Baker D., Nogales E., **2014**. High-resolution microtubule structures reveal the structural transitions in ab-tubulin upon GTP hydrolysis. *Cell.* 22;**157**(5):1117-29.
- Amato S.**, Liu X., Zheng B., Cantley L., Rakic P., Man H.Y., **2011**. AMP-activated protein kinase regulates neuronal polarization by interfering with PI 3-kinase localization. *Science.* 8;**332**(6026):247-51.
- Amin M.A.**, Itoh G., Iemura K., Ikeda M., Tanaka K., **2014**. CLIP-170 recruits PLK1 to kinetochores during early mitosis for chromosome alignment. *J. Cell Sci.* 1;**127**(Pt 13):2818-24.
- Amin M.A.**, Kobayashi K., Tanaka K., **2015**. CLIP-170 tethers kinetochores to microtubule plus ends against poleward force by dynein for stable kinetochore-microtubule attachment. *FEBS Lett.* 14;**589**(19 Pt B):2739-46.
- Amos L.A.**, **2011**. What tubulin drugs tell us about microtubule structure and dynamics. *Semin. Cell Dev. Biol.* 22(9):916-26.
- Anders A.**, Sawin K.E., **2011**. Microtubule stabilization in vivo by nucleation-incompetent γ -tubulin complex. *J. Cell Sci.* 15;**124**(Pt 8):1207-13.
- Andrews P.D.**, Ovechkina Y., Morrice N., Wagenbach M., Duncan K., Wordeman L., Swedlow J.R., **2004**. Aurora B regulates MCAK at the mitotic centromere. *Dev. Cell.* 6(2):253-68.
- Arce C.A.**, Rodriguez J.A., Barra H.S., Caputo R., **1975**. Incorporation of L-tyrosine, L-phenylalanine and L-3,4-dihydroxyphenylalanine as single units into rat brain tubulin. *Eur. J. Biochem.* 1;**59**(1):145-9.
- Argaraña C.E.**, Barra H.S., Caputto R., **1978**. Release of [¹⁴C]tyrosine from tubuliny-[¹⁴C]tyrosine by brain extract. Separation of a carboxypeptidase from tubulin-tyrosine ligase. *Mol. Cell Biochem.* 24;**19**(1):17-21.
- Argaraña C.E.**, Barra H.S., Caputto R., **1980**. Tubuliny-tyrosine carboxypeptidase from chicken brain: properties and partial purification. *J. Neurochem.* 34(1):114-8.

Arnal I. and Wade R.H., **1995**. How does taxol stabilize microtubules? *Curr. Biol.* 1;**5**(8):900-8.

Arnal I., Heichette C., Diamantopoulos G.S., Chrétien D., **2004**. CLIP-170/tubulin-curved oligomers coassemble at microtubule ends and promote rescues. *Curr. Biol.* 14;**14**(23):2086-95.

Auckland P. and McAinsh A.D., **2015**. Building and integrated model of chromosome congression. *J. Cell Sci.* 15;**128**(18):3363-74.

B

Baas P.W., **2014**. Beyond taxol: microtubule-based strategies for promoting nerve regeneration after injury. *Neural. Regen. Res.* 1;**9**(13):1265-6.

Baas P.W. and Buster D.W., **2004**. Slow axonal transport and the genesis of neuronal morphology. *J. Neurobiol.* **58**(1):3-17.

Bahi-Buisson N. and Cavallin M., **2016**. Tubulinopathies Overview. *Gene Reviews® [Internet]*. University of Washington, Seattle; 1193-2017.

Bailey M.E., Jiang N., Dima R.I., Ross J.L., **2016**. Invited review: Microtubule severing enzymes couple atpase activity with tubulin GTPase spring loading. *Biopolymers.* **105**(8):547-56.

Bain J., Plater L., Elliott M., Shpiro N., Hastie C.J., McLauchlan H., Klevernic I., Arthur J.S., Alessi D.R., Cohen P., **2007**. The selectivity of protein kinase inhibitors: a further update. *Biochem. J.* 15;**408**(3):297-315.

Ban R., Matsuzaki H., Akashi T., Sakashita G., Taniguchi H., Park S.Y., Tanaka H., Furukawa K., Urano T., **2009**. Mitotic regulation of the stability of microtubule plus-end tracking protein EB3 by ubiquitin ligase SIAH-1 and Aurora mitotic kinases. *J. Biol. Chem.* 9;**284**(41):28367-81.

Ban Y., Kobayashi Y., Hara T., Hamada T., Hashimoto T., Takeda S., Hattori T., **2013**. α -tubulin is rapidly phosphorylated in response to hyperosmotic stress in rice and Arabidopsis. *Plant Cell Physiol.* **54**(6):848-58.

Barisic M., Silva e Sousa R., Tripathy S.K., Magiera M.M., Zaytsev A.V., Pereira A.L., Janke C., Grishchuk E.L., Maiato H., **2015**. Mitosis. Microtubule deetyrosination guides chromosomes during mitosis. *Science.* 15;**348**(6236):799-803.

Barlan K. and Gelfand V.I., **2017**. Microtubule-based transport and the distribution, tethering, and organization of organelles. *Cold Spring Harb. Perspect. Biol.* 1;**9**(5):a025817.

Barth A.I., Caro-Gonzalez H.Y., Nelson W.J., **2008**. Role of adenomatous polyposis coli (APC) and microtubules in directional cell migration and neuronal polarization. *Semin. Cell Dev. Biol.* **19**(3):245-51.

Barra H.S., Rodriguez J.A., Arce C.A., Caputto R., **1973**. A soluble preparation from rat brain that incorporates into its own proteins (14C)arginine by a ribonuclease-sensitive system and (14C)tyrosine by a ribonuclease-insensitive system. *J. Neurochem.* **20**(1):97-108.

Bashour A.M., Fullerton A.T., Hart M.J., Bloom G.S., **1997**. IQGAP1, a Rac- and Cdc42-binding protein, directly binds and cross-links microfilaments. *J. Cell Biol.* 30;**137**(7):1555-66.

Bates D. and Eastman A., **2017**. Microtubule destabilizing agents: far more than just antimetabolic anticancer drugs. *Br. J. Clin. Pharmacol.* **83**(2):255-268.

Beaven R., Dzhindzhev N.S., Qu Y., Hahn I., Dajas-Bailador F., Ohkura H., Prokop A., **2015**. Drosophila CLIP-190 and mammalian CLIP-170 display reduced microtubule plus end association in the nervous system. *Mol. Biol. Cell.* 15;**26**(8):1491-508.

- Beinhauer J.D.**, Hagan I.M., Hegemann J.H., Fleig U., **1997**. Mal3, the fission yeast homologue of the human APC-interacting protein EB-1 is required for microtubule integrity and the maintenance of cell form. *J. Cell Biol.* 3;**139**(3):717-28.
- Bellett G.**, Carter J.M., Keynton J., Goldspink D., James C., Moss D.K., Mogensen M.M., **2009**. Microtubule plus-end and minus-end capture at adherens junctions is involved in the assembly of apico-basal arrays in polarized epithelial cells. *Cell. Motil. Cytoskeleton.* **66**(10):893-908.
- 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.* 23;**84**(4):623-31.
- Bennett B.L.**, Sasaki D.T., Murray B.W., O'Leary E.C., Sakata S.T., Xu W., Leisten J.C., Motiwala A., Pierce S., Satoh Y., Bhagwat S.S., Manning A.M., Anderson D.W., **2001**. SP600125, an anthracycline inhibitor of Jun N-terminal kinase. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* 20;**98**(24):13681-6.
- Berlin V.**, Styles C.A., Fink G.R., **1990**. BIK1, a protein required for microtubule function during mating and mitosis in *Saccharomyces cerevisiae*, colocalizes with tubulin. *J. Cell Biol.* **111**(6 Pt 1):2573-86.
- Bhat K.M.** and Setaluri V., **2007**. Microtubule-associated proteins as targets in cancer chemotherapy. *Clin. Cancer Res.* 15;**13**(10):2849-54.
- Bhattacharya R.**, Yang H., Cabral F., **2011**. Class V β -tubulin alters dynamic instability and stimulates microtubule detachment from centrosomes. *Mol. Biol. Cell.* **22**(7):1025-34.
- Bieling P.**, Kandels-Lewis S., Telley I.A., van Dijk J., Janke C., Surrey T., **2008**. CLIP-170 tracks growing microtubule ends by dynamically recognizing composite EB1/tubulin-binding sites. *J. Cell Biol.* 29;**183**(7):1223-33.
- Bieling P.**, Laan L., Schek H., Munteanu E.L., Sandblad L., Dogterom M., Brunner D., Surrey T., **2007**. Reconstitution of a microtubule plus-end tracking system in vitro. *Nature.* 13;**450**(7172):1100-5.
- Bieling P.**, Telley I.A., Surrey T., **2010**. A minimal midzone protein module controls formation and length of antiparallel microtubule overlaps. *Cell.* 6;**142**(3):420-32.
- Bilbe G.**, Delabie J., Brügger J., Richener H., Asselbergs F.A., Cerletti N., Sorg C., Odink K., Tarcsay L., Wiesendanger W., et al., **1992**. Restin: a novel intermediate filament-associated protein highly expressed in the Reed-Sternberg cells of Hodgkin's disease. *EMBO J.* **11**(6):2103-13.
- Binder L.I.**, Frankfurter A., Rebhun L.I., **1985**. The distribution of tau in the mammalian central nervous system. *J. Cell Biol.* **101**(4):1371-8.
- Binker M.G.**, Zhao D.Y., Pang S.J., Harrison R.E., **2007**. Cytoplasmic linker protein-170 enhances spreading and phagocytosis in activated macrophages by stabilizing microtubules. *J. Immunol.* 15;**179**(6):3780-91.
- Bjelić S.**, De Groot C.O., Schärer M.A., Jaussi R., Bargsten K., Salzmänn M., Frey D., Capitani G., Kammerer R.A., Steinmetz M.O., **2012**. Interaction of mammalian end binding proteins with CAP-Gly domains of CLIP-170 and p150^{Glued}. *J. Struct. Biol.* **177**(1):160-7.
- Bloomfield G.** and Kay R.R. **2016**. Uses and abuses of micropinocytosis. *J. Cell Sci.* 15;**129**(14):2697-705.
- Bode A.M.** and Dong Z., **2007**. The functional contrariety of JNK. *Mol. Carcinog.* **46**(8):591-8.
- Bogoyevitch M.A.**, Yeap Y.Y., Qu Z., Ngoei K.R., Yip Y.Y., Zhao T.T., Heng J.I., Ng D.C., **2012**. WD40-repeat protein 62 is a JNK-phosphorylated spindle pole protein required for spindle maintenance and timely mitotic progression. *J. Cell Sci.* 1;**125**(Pt 21):5096-109.

- Bonufacino J.S.** and Neefjes J., **2017**. Moving and positioning the endolysosomal system. *Curr. Opin. Cell Biol.* **47**:1-8.
- Bonnet C.**, Boucher D., Lazereg S., Pedrotti B., Islam K., Denoulet P., Larcher J.C., **2001**. Differential binding regulation of microtubule-associated proteins MAP1A, MAP1B, and MAP2 by tubulin polyglutamylation. *J. Biol. Chem.* **276**(16):12839-48.
- Boucher D.**, Larcher J.C., Gros F., Denoulet P., **1994**. Polyglutamylation of tubulin as a progressive regulator of in vitro interactions between the microtubule-associated protein Tau and tubulin. *Biochemistry.* **33**(41):12471-7.
- Borisy G.G.** and Taylor E.W., **1967a**. The mechanism of action of colchicine. Binding of colchicine-3H to cellular protein. *J. Cell Biol.* **34**(2):525-33.
- Borisy G.G.** and Taylor E.W., **1967b**. The mechanism of action of colchicine. Colchicine binding to sea urchin eggs and the mitotic apparatus. *J. Cell Biol.* **34**(2):535-48.
- Borisy G.**, Heald R., Howard J., Janke C., Musacchio A., Nogales E., **2016**. Microtubules: 50 years on from the discovery of tubulin. *Nat. Rev. Mol. Cell. Biol.* **17**(5):322-28.
- Borisy G.G.**, Marcum J.M., Olmsted J.B., Murphy D.B., Johnson K.A., **1975**. Purification of tubulin and associated high molecular weight proteins from porcine brain and characterization of microtubule assembly in vitro. *Ann. N.Y. Acad. Sci.* **30**:253:107-32.
- Bornens M.**, **2012**. The centrosome in cells and organisms. *Science.* **335**(6067):422-6.
- Boscheron C.**, Caudron F., Loeillet S., Peloso C., Mugnier M., Kurzawa L., Nicolas A., Denarier E., Aubry L., Andrieux A., **2016**. A role for the yeast CLIP170 ortholog, the plus-end-tracking protein Bik1, and the Rho1 GTPase in Snc1 trafficking. *J. Cell Sci.* **129**(17):3332-41.
- Bouissou A.**, Vérollet C., Sousa A., Sampaio P., Wright M., Sunkel C.E., Merdes A., Raynaud-Messina B., **2009**. γ -Tubulin ring complexes regulate microtubule plus end dynamics. *J. Cell Biol.* **187**(3):327-34.
- Boulton T.G.** and Cobb M.H., **1991**. Identification of multiple extracellular signal-regulated kinases (ERKs) with antipeptide antibodies. *Cell. Regul.* **2**(5):357-71.
- Boulton T.G.**, Nye S.H., Robbins D.J., Ip N.Y., Radziejewska E., Morgenbesser S.D., DePinho R.A., Panayotas N., Cobb M.H., Yancopoulos G.D., **1991**. ERKs: a family of protein-serine/threonine kinases that are activated and tyrosine phosphorylated in response to insulin and NGF. *Cell.* **65**(4):663-75.
- Boulton T.G.**, Yancopoulos G.D., Gregory J.S., Slaughter C., Moomaw C., Hsu J., Cobb M.H., **1990**. An insulin-stimulated protein kinase similar to yeast kinases involved in cell cycle control. *Science.* **249**(4964):64-7.
- Bowles K.R.** and Jones L., **2014**. Kinase signaling in Huntington's disease. *J. Huntingtons Dis.* **3**(2):89-123.
- Bowne-Anderson H.**, Hibbel A., Howard J., **2015**. Regulation of microtubule growth and catastrophe: unifying theory and experiment. *Trends Cell Biol.* **25**(12):769-79.
- Bowne-Anderson H.**, Zanic M., Kauer M., Howard J., **2013**. Microtubule dynamic instability: a new model with coupled GTP hydrolysis and multistep catastrophe. *Bioessays.* **35**(5):452-61.
- Bratman S.V.** and Chang F., **2007**. Stabilization of overlapping microtubules by fission yeast CLASP. *Dev. Cell.* **13**(6):812-27.

- Breuss M.W., Leca I., Gstrein T., Hansen A.H., Keays D.A., 2017.** Tubulins and brain development – The origins of functional specification. *Mol. Cell Neurosci.* **7431**(16):30250-0.
- Brittle A.L. and Ohkura H., 2005.** Mini spindles, the XMAP215 homologue, suppresses pausing of interphase microtubules in *Drosophila*. *EMBO J.* **6**;24(7):1387-96.
- Brouhard G.J., 2015.** Dynamic instability 30 years later: complexities in microtubule growth and catastrophe. *Mol. Biol. Cell.* **1**;26(7):1207-10.
- Brouhard G.J., and Rice L.M., 2014.** The contribution of $\alpha\beta$ -tubulin curvature to microtubule dynamics. *J. Cell Biol.* **10**;207(3):323-34.
- Brouhard G.J., Stear J.H., Noetzel T.L., Al-Bassam J., Kinoshita K., Harrison S.C., Hyman A.A., 2008.** XMAP215 is a processive microtubule polymerase. *Cell.* **11**;132(1):79-88.
- Browning H. and Hackney D.D., 2005.** The EB1 homolog Mal3 stimulates the ATPase of the kinesin Tea2 by recruiting it to the microtubule. *J. Biol. Chem.* **1**;280(13):12299-304.
- Browning H., Hackney D.D., Nurse P., 2003.** Targeted movement of cell end factors in fission yeast. *Nat. Cell Biol.* **5**(9):812-8.
- Brunner D. and Nurse P., 2000.** CLIP-170-like tip1p spatially organizes microtubular dynamics in fission yeast. *Cell.* **1**;102(5):695-704.
- Bu W. and Su L.K., 2001.** Regulation of microtubule assembly by human EB1 family proteins. *Oncogene.* **31**;20(25):3185-92.
- Bu W. and Su L.K., 2003.** Characterization of functional domains of human EB1 family proteins. *J. Biol. Chem.* **12**;278(50):49721-31.
- Bubici C. and Papa S., 2014.** JNK signaling in cancer: in need of new, smarter therapeutic targets. *Br. J. Pharmacol.* **171**(1):24-37.
- Buée-Scherrer V. and Goedert M., 2002.** Phosphorylation of microtubule-associated protein tau by stress-activated protein kinases in intact cells. *FEBS Lett.* **27**;515(1-3):151-4.
- Buée L., Bussièrè T., Buée-Scherrer V., Delacourte A., Hof P.R., 2000.** Tau protein isoforms, phosphorylation and role in neurodegenerative disorders. *Brain Res. Brain Res. Rev.* **33**(1):95-130.
- Buey R.M., Mohan R., Leslie K., Walzthoeni T., Missimer J.H., Menzel A., Bjelic S., Bargsten K., Grigoriev I., Smal I., Meijering E., Aebersold R., Akhmanova A., Steinmetz M.O., 2011.** Insights into EB1 structure and the role of its C-terminal domain for discriminating microtubule tips from the lattice. *Mol. Biol. Cell.* **15**;22(16):2912-23.
- 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.* **6**;14(7):548-59.
- Busch K.E., Hayles J., Nurse P., Brunner D., 2004.** Tea2p kinesin is involved in spatial microtubule organization by transporting tip1p on microtubules. *Dev. Cell.* **6**(6):831-43.
- Butler M.T. and Wallingford J.B., 2017.** Planar cell polarity in development and disease. *Nat. Rev. Mol. Cell Biol.* **18**(6):375-388.
- Butner K.A. and Kirschner M.W., 1991.** Tau protein binds to microtubules through a flexible array of distributed weak sites. *J. Cell Biol.* **115**(3):717-30.

C

- Caceres A.** and Kosik K.S., **1990**. Inhibition of neurite polarity by tau antisense oligonucleotide in primary cerebellar neurons. *Nature*. 1;**343**(6257):461-3.
- Cai D.**, Hoppe A.D., Swanson J.A., Verhey K.J., **2007**. Kinesin-1 structural organization and conformational changes revealed by FRET stoichiometry in live cells. *J. Cell Biol.* 1;**176**(1):51-63.
- Cai S.**, Weaver L.N., Ems-McClung S.C., Walczak C.E., **2009**. Kinesin-14 family proteins HSET/XCTK2 control spindle length by cross-linking and sliding microtubules. *Mol. Biol. Cell.* **20**(5):1348-59.
- Calligaris D.**, Verdier-Pinard P., Devred F., Villard C., Braguer D., Lafitte D., **2010**. Microtubule targeting agents: from biophysics to proteomics. *Cell Mol. Life Sci.* **67**(7):1089-104.
- Caplow M.** & Shanks J., **1996**. Evidence that a single monolayer tubulin-GTP cap is both necessary and sufficient to stabilize microtubules. *Mol. Biol. Cell.* **7**(4):663-75.
- Cargnello M.** and Roux P.P., **2001**. Activation and function of the MAPKs and their substrates, the MAPK-activated protein kinases. *Microbiol. Mol. Rev.* **75**(1):50-83.
- Carlson S.M.**, Chouinard C.R., Labadorf A., Lam C.J., Schmelzle K., Fraenkel E., White F.M., **2011**. Large-scale discovery of ERK2 substrates identifies ERK-mediated transcriptional regulation by ETV3. *Sci. Signal.* **25**;4(196):rs11.
- Caro-Gonzalez H.Y.**, Nejsum L.N., Siemers K.A., Shaler T.A., Nelson W.J., Barth A.I., **2012**. Mitogen-activated protein kinase (MAPK/ERK) regulates adenomatous polyposis coli during growth-factor-induced cell extension. *J. Cell Sci.* 1;**125**(Pt 5):1247-58.
- Caron J.M.**, **1997**. Posttranslational modification of tubulin by palmitoylation: I. In vivo and cell-free studies. *Mol. Biol. Cell.* **8**(4):621-36.
- Caron J.M.**, Vega L.R., Fleming J., Bishop R., Solomon F., **2001**. Single site alpha-tubulin mutation affects astral microtubules and nuclear positioning during anaphase in *Saccharomyces cerevisiae*: possible role for palmitoylation of alpha-tubulin. *Mol. Biol. Cell.* **12**(9):2672-87.
- Carvalho P.**, Gupta M.L. Jr., Hoyt M.A., Pellman D., **2004**. Cell cycle control of kinesin-mediated transport of Bik1 (CLIP-170) regulates microtubule stability and dynein activation. *Dev. Cell.* **6**(6):815-29.
- Cassimeris L.**, Gard D., Tran P.T., Erickson H.P., **2001**. XMAP215 is a long thin molecule that does not increase microtubule stiffness. *J. Cell Sci.* **114**(Pt 16):3025-33.
- Chabin-Brion K.**, Marceiller J., Perez F., Settegrana C., Drechou A., Durand G., Poüs C., **2001**. The Golgi complex is a microtubule-organizing organelle. *Mol. Biol. Cell.* **12**(7):2047-60.
- Chakraborti S.**, NNatarajan K., Curiel J., Janke C., Liu J., **2016**. The emerging role of the tubulin code: from the tubulin molecule to neuronal function and disease. *Cytoskeleton (Hoboken).* **73**(10):521-550.
- Chang L.**, Jones Y., Ellisman M.H., Goldstein L.S., Karin M., **2003**. JNK1 is required for maintenance of neuronal microtubules and controls phosphorylation of microtubule-associated proteins. *Dev. Cell.* **4**(4):521-33.
- Charrasse S.**, Schroeder M., Gauthier-Rouviere C., Ango F., Cassimeris L., Gard D.L., Larroque C., **1998**. The TOGp protein is a new human microtubule-associated protein homologous to the *Xenopus* XMAP215. *J. Cell Sci.* **111**(Pt 10):1371-83.

- Chatterjee S.J.** and McCaffrey L., **2014**. Emerging role of cell polarity proteins in breast cancer progression and metastasis. *Breast Cancer (Dove Med. Press.)*. 9;**6**:15-27.
- Chen D.**, Huang J.F., Liu K., Zhang L.Q., Yang Z., Chuai Z.R., Wang Y.X., Shi D.C., Huang Q., Fu W.L., **2014b**. BRAFV600E mutation and its association with clinicopathological features of colorectal cancer: a systematic review and meta-analysis. *PLoS One*. 3;**9**(3):e90607.
- Chen J.**, Kanai Y., Cowan N.J., Hirokawa N., **1992**. Projection domains of MAP2 and tau determine spacings between microtubules in dendrites and axons. *Nature*. 17;**360**(6405):674-7.
- Chen J.**, Luo Y., Li L., Ran J., Wang X., Gao S., Liu M., Li D., Shui W., Zhou J., **2014a**. Phosphoregulation of the dimerization and functions of end-binding protein 1. *Protein Cell*. **5**(10):795-9.
- Chinnaronk S.**, Sitthiroongruang J., Srisucharitpanit K., Srisaisup M., Ketterman A.J., Boonserm P., **2015**. The crystal structure of JNK from *Drosophila melanogaster* reveals an evolutionarily conserved topology with that of mammalian JNK proteins. *BMC Struct. Biol.* 16;**15**:17.
- Choi J.H.**, Adames N.R., Chan T.F., Zeng C., Cooper J.A., Zheng X.F., **2000**. TOR signaling regulates microtubule structure and function. *Curr Biol*. 13;**10**(14):861-4.
- Choi J.H.**, Bertram P.G., Drenan R., Carvalho J., Zhou H.H., Zheng X.F., **2002**. The FKBP12-rapamycin-associated protein (FRAP) is a CLIP-170 kinase. *EMBO Rep*. **3**(10):988-94.
- Choudhary C.**, Kumar C., Gnad F., Nielsen M.L., Rehman M., Walther T.C., Olsen J.V., Mann M., **2009**. Lysine acetylation targets protein complexes and co-regulates major cellular functions. *Science*. 14;**325**(5942):834-40.
- Chowdhury S.**, Ketcham S.A., Schroer T.A., Lander G.C., **2015**. Structural organization of the dynein-dynactin complex bound to microtubules. *Nat. Struct. Mol. Biol.* **22**(4):345-7.
- Chrétien D.**, Fuller S.D., Karsenti E., **1995**. Structure of growing microtubule ends: two-dimensional sheets close into tubes at variable rates. *J. Cell Biol.* **129**(5):1311-28.
- Chu C.W.**, Hou F., Zhang J., Phu L., Loktev A.V., Kirkpatrick D.S., Jackson P.K., Zhao Y., Zhou H., **2011**. A novel acetylation of β -tubulin by San modulates microtubule polymerization via down-regulating tubulin incorporation. *Mol. Biol. Cell*. 15;**22**(4):448-56.
- Cianfrocco M.A.**, DeSantis M.E., Leschziner A.E., Reck-Peterson S.L., **2015**. Mechanism and regulation of cytoplasmic dynein. *Annu. Rev. Cell Dev. Biol.* **31**:83-108.
- Cicchillitti L.**, Penci R., Di Michele M., Filippetti F., Rotilio D., Donati M.B., Scambia G., Ferlini C., **2008**. Proteomic characterization of cytoskeletal and mitochondrial class III beta-tubulin. *Mol. Cancer Ther.* **7**(7):2070-9.
- Cleveland D.W.**, Hwo S.Y., Kirschner M.W., **1977**. Physical and chemical properties of purified tau factor and the role of tau in microtubule assembly. *J. Mol. Biol.* 25;**116**(2):227-47.
- Cobb M.H.**, Rosen O.M., **1983**. Description of a protein kinase derived from insulin-treated 3T3-L1 cells that catalyzes the phosphorylation of ribosomal protein S6 and casein. *J. Biol. Chem.* 25;**258**(20):12472-81.
- Coffey E.T.**, **2014**. Nuclear and cytosolic JNK signaling in neurons. *Nat. Rev. Neurosci.* **15**(5):285-99.
- Collazos A.**, Michael N., Whelan R.D., Kelly G., Mellor H., Pang L.C., Totty N., Parker P.J., **2011**. Site recognition and substrate screens for PKN family proteins. *Biochem. J.* 15;**438**(3):535-43.

Conde C., Cáceres A., 2009. Microtubule assembly, organization and dynamics in axons and dendrites. *Nat. Rev. Neurosci.* **10**(5):319-32.

Coombes C.E., Yamamoto A., Kenzie M.R., Odde D.J., Gardner M.K., 2013. Evolving tip structures can explain age-dependent microtubule catastrophe. *Curr. Biol.* **22**;23(14):1342-8.

Coquelle F.M., Caspi M., Cordelières F.P., Dompierre J.P., Dujardin D.L., Koifman C., Martin P., Hoogenraad C.C., Akhmanova A., Galjart N., De Mey J.R., Reiner O., 2002. LIS1, CLIP-170's key to the dynein/dynactin pathway. *Mol. Cell Biol.* **22**(9):3089-102.

Coquelle F.M., Vitre B., Arnal I., 2009. Structural basis of EB1 effects on microtubule dynamics. *Biochem. Soc. Trans.* **37**(Pt 5):997-1001.

Courcelles M., Frémin C., Voisin L., Lemieux S., Meloche S., Thibault P., 2013. Phosphoproteome dynamics reveal novel ERK1/2 MAP kinase substrates with broad spectrum of functions. *Mol. Syst. Biol.* **28**;9:669.

Cox G.A., Mahaffey C.L., Nystuen A., Letts V.A., Frankel W.N., 2000. The mouse fidgetin gene defines a new role for AAA family proteins in mammalian development. *Nat. Genet.* **26**(2):198-202.

Coy D.L., Hancock W.O., Wagenbach M., Howard J., 1999. Kinesin's tail domain is an inhibitory regulator of the motor domain. *Nat. Cell. Biol.* **1**(5):288-92.

Cragg G.M., 1998. Paclitaxel (Taxol): a success story with valuable lessons for natural product drug discovery and development. *Med. Res. Rev.* **18**(5):315-31.

Cross R.A. and McAinsh A., 2014. Prime movers: the mechanochemistry of mitotic kinesins. *Nat. Rev. Mol. Cell Biol.* **15**(4):257-71.

Cuadrado A. and Nebreda A.R., 2010. Mechanisms and functions of p38 MAPK signalling. *Biochem. J.* **429**(3):403-17.

Cuenda A., Rouse J., Doza Y.N., Meier R., Cohen P., Gallagher T.F., Young P.R., Lee J.C., 1995. SB 203580 is a specific inhibitor of a MAP kinase homologue which is stimulated by cellular stresses and interleukine-1. *FEBS Lett.* **8**;364(2):229-33.

Currin E.S. and Gopal A.K., 2012. Treatment strategies for Hodgkin lymphoma recurring following autologous hematopoietic stemcell transplantation. *Korean J. Hematol.* **47**(1):8-16.

D

Daire V. and Poüs C., 2011. Kinesins and protein kinases: key players in the regulation of microtubule dynamics and organization. *Arch. Biochem. Biophys.* **15**;510(2):83-92.

Daire V., Giustiniani J., Leroy-Gori I., Quesnoit M., Drevensek S., Dimitrov A., Perez F., Poüs C., 2009. Kinesin-1 regulates microtubule dynamics via c-Jun N-terminal kinase-dependent mechanism. *J. Biol. Chem.* **13**;284(46):31992-2001.

Davis R., 2000. Signal transduction by the JNK group of MAP kinases. *Cell*, **103**(11): 239-252.

Davis R.J., 1993. The mitogen-activated protein kinase signal transduction pathway. *J. Biol. Chem.* **15**;268(20):14553-6.

Dawe A.L., Caldwell K.A., Harris P.M., Morris N.R., Caldwell G.A., 2001. Evolutionarily conserved nuclear migration genes required for early embryonic development in *Caenorhabditis elegans*. *Dev. Genes Evol.* **211**(8-9): 434-41.

- De S.**, Tsimounis A., Chen X., Rotenberg S.A., **2014**. Phosphorylation of α -tubulin by protein kinase C stimulates microtubule dynamics in human breast cells. *Cytoskeleton (Hoboken)*. **71**(4):257-72.
- De Forges H.**, Bouissou A., Perez F., **2012**. Interplay between microtubule dynamics and intracellular organization. *Int. J. Biochem. Cell Biol.* **44**(2):266-74.
- De Forges H.**, Pilon A., Cantaloube I., Pallandre A., Hadhiri-Gosnet A.M., Perez F., Poüs C., **2016**. Localized mechanical stress promotes microtubule rescue. *Curr. Biol.* **19**;26(24):3399-3406.
- De Forges H.**, Pilon A., Poüs C., Perez F., **2013**. Imaging GTP-bound tubulin: from cellular to in vitro assembled microtubules. *Methods Cell Biol.* **115**:139-53.
- De Groot C.O.**, Jelesarov I., Damberger F.F., Bjelić S., Schärer M.A., Bhavesh N.S., Grigoriev I., Buey R.M., Wüthrich K., Capitani G., Akhmanova A., Steinmetz M.O., **2010**. Molecular insights into mammalian end-binding protein heterodimerization. *J. Biol. Chem.* **19**;285(8):5802-14.
- Dehmelt L.** and Halpain S., **2005**. The MAP2/Tau family of microtubule-associated proteins. *Genome Biol.* **6**(1):204.
- Delabie J.**, Bilbe G., Brügggen J., van Leuven F., De Wolf-Peeters C., **1993**. Restin in Hodgkin's disease and anaplastic large cell lymphoma. *Leuk. Lymphoma*. **12**(1-2):21-6.
- Delabie J.**, Shipman R., Brügggen J., De Strooper B., van Leuven F., Tarcsay L., Cerletti N., Odink K., Diehl V., Bilbe G., et al., **1992**. Expression of the novel intermediate filament-associated protein restin in Hodgkin's disease and anaplastic large-cell lymphoma. *Blood*. **1**;80(11):2891-6.
- Dérjard B.**, Hibi M., Wu I.H., Barrett T., Su B., Deng T., Karin M., Davis R.J., **1994**. JNK1: a protein kinase stimulated by UV light and Ha-Ras that binds and phosphorylates the c-Jun activation domain. *Cell*. **25**;76(6):1025-37.
- Derry W.B.**, Wilson L., Khan I.A., Ludueña R.F., Jordan M.A., **1997**. Taxol differentially modulates the dynamics of microtubules assembled from unfractionated and purified beta-tubulin isotypes. *Biochemistry*. **25**;36(12):3554-62.
- DeSantis M.E.**, Cianfrocco M.A., Htet Z.M., Tran P.T., Reck-Peterson S.L., Leschziner A.E., **2017**. Lis1 has two opposing modes of regulating cytoplasmic dynein. *Cell*. **7**;170(6):1197-1208.
- Desai A.** and Mitchison T.J., **1997**. Microtubule polymerization dynamics. *Annu. Rev. Cell Dev. Biol.* **13**:83-117.
- des Portes V.**, Pinard J.M., Billuart P., Vinet M.C., Koulakoff A., Carrié A., Gelot A., Dupuis E., Motte J., Berwald-Netter Y., Catala M., Kahn A., Beldjord C., Chelly J., **1998**. A novel CNS gene required for neuronal migration and involved in X-linked subcortical laminarheterotopia and lissencephaly syndrome. *Cell*. **9**;92(1):51-61.
- De Zeeuw C.I.**, Hoogenraad C.C., Goedknecht E., Hertzberg E., Neubauer A., Grosveld F., Galjart N., **1997**. CLIP-115, a novel brain-specific cytoplasmic linker protein, mediates the localization of dendritic lamellar bodies. *Neuron*. **19**(6):1187-99.
- Dhamodharan R.**, Wadsworth P., **1995**. Modulation of microtubule dynamic instability in vivo by brain microtubule associated proteins. *J. Cell Sci.* **108**(Pt 4):1679-89.
- Diamantopoulos G.S.**, Perez F., Goodson H.V., Batelier G., Melki R., Kreis T.E., Rickard J.E., **1999**. Dynamic localization of CLIP-170 to microtubule plus ends is coupled to microtubule assembly. *J. Cell Biol.* **11**;144(1):99-112.
- Díaz-Nido J.**, Serrano L., López-Otín C., Vandekerckhove J., Avila J., **1990**. Phosphorylation of a neuronal-specific beta-tubulin isotype. *J. Biol. Chem.* **15**;265(23):13949-54.

- Dillon L.M.**, Bean J.R., Yang W., Shee K., Symonds L.K., Balko J.M., McDonald W.H., Liu S., Gonzalez-Angulo A.M., Mills G.B., Arteaga C.L., Miller T.W., **2015**. P-REX1 creates a positive feedback loop to activate growth factor receptor, PI3K/AKT and MEK/ERK signaling in breast cancer. *Oncogene*. 23;**34**(30):3968-76.
- Dimitrov A.**, Quesnoit M., Moutel S., Cantaloube I., Poüs C., Perez F., **2008**. Detection of GTP-tubulin conformation in vivo reveals a role for GTP remnants in microtubule rescues. *Science*. 28;**322**(5906):1353-6.
- Dix C.I.**, Soudararajan H.C., Dzhindzhev N.S., Begum F., Suter B., Ohkura H., Stephens E., Bullock S.L., **2013**. Lissencephaly-1 promotes the recruitment of dynein and dynactin to transported mRNAs. *J. Cell Biol.* 5;**202**(3):479-94.
- Dixit R.**, Barnette B., Lazarus J.E., Tokito M., Goldman Y.E., Holzbaur E.L., **2009**. Microtubule plus-end tracking by CLIP-170 requires EB1. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* 13;**106**(2):492-7.
- Dobyns W.B.**, Reiner O., Carrozzo R., Ledbetter D.H., **1993**. Lissencephaly. A human brain malformation associated with deletion of the LIS1 gene located at chromosome 17p13. *JAMA*. 15;**270**(23):2838-42.
- Dodding M.P.** and Way M., **2011**. Coupling viruses to dynein and kinesin-1. *EMBO J.* 31;**30**(17):3527-39.
- Dong C.**, Yang D.D., Wusk M., Whitmarsh A.J., Davis R.J., Flavell R.A., **1998**. Defective T cell differentiation in the absence of Jnk1. *Science*. 11;**282**(5396):2092-5.
- Dorléans A.**, Gigant B., Ravelli R.B., Mailliet P., Mikol V., Knossow M., **2009**. Variations in the colchicine-binding domain provide insight into the structural switch of tubulin. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* 18;**106**(33):13775-9.
- Dougherty C.A.**, Sage C.R., Davis A., Farrell K.W., **2001**. Mutation in the beta-tubulin signature motif suppresses microtubule GTPase activity and dynamics, and slows mitosis. *Biochemistry*. 25;**40**(51):15725-32.
- Drabek K.**, Gutiérrez L., Vermeij M., Clapes T., Patel S.R., Boisset J.C., van Haren J., Pereira A.L., Liu Z., Akinci U., Nikolic T., va, Ijcken W., van den Hout M., Meinders M., Melo C., Sambade C., Drabek D., Hendriks R.W., Philipsen S., Mommaas M., Grosveld F., Maiato H., Italiano J.E. Jr., Robin C., Galjart N., **2012**. The microtubule plus-end tracking protein CLASP2 is required for hematopoiesis and hematopoietic stem cell maintenance. *Cell Rep.* 25;**2**(4):781-8.
- Drabek K.**, van Ham M., Stepanova T., Draegestein K., van Horsen R., Sayas C.L., Akhmanova A., Ten Hagen T., Smits R., Fodde R., Grosveld F., Galjart N., **2006**. Role of CLASP2 in microtubule stabilization and the regulation of persistent motility. *Curr. Biol.* 21;**16**(22):2259-64.
- Draegestein K.A.**, van Cappellen W.A., van Haren J., Tsibidis G.D., Akhmanova A., Knoch T.A., Grosveld F., Galjart N., **2008**. Dynamic behavior of GFP-CLIP-170 reveals fast protein turnover on microtubule plus ends. *J. Cell Biol.* 25;**180**(4):729-37.
- Drechsel D.N.** and Kirschner M.W., **1994**. The minimum GTP cap required to stabilize microtubules. *Curr. Biol.* 1;**4**(12):1053-61.
- Drechsler H.** and McAinsh A.D., **2016**. Kinesin-12 motors cooperate to suppress microtubule catastrophes and drive the formation of parallel microtubule bundles. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* 22;**113**(12):E1635-44.
- Dreskin S.C.**, Thomas G.W., Dale S.N., Heasley L.E., **2001**. Isoforms of Jun kinase are differentially expressed and activated in human monocyte/macrophage (THP-1) cells. *J. Immunol.* 1;**166**(9):5646-53.

Drewes G., Lichtenberg-Kraag B., Döring F., Mandelkow E.M., Biernat J., Goris J., Dorée M., Mandelkow E., 1992. Mitogen activated protein (MAP) kinase transforms tau protein into an Alzheimer-like state. *EMBO J.* **11**(6):2131-8.

Drewes G., Trinczek B., Illenberger S., Biernat J., Schmitt-Ulms G., Meyer H.E., Mandelkow E.M., 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.* **31;270**(13):7679-88.

Drubin D.G. and Kirschner M.W., 1986. Tau protein function in living cells. *J. Cell Biol.* **103**(6 Pt 2):2739-46.

Dudley D.T., Pang L., Decker S.J., Bridges A.J., Saltiel A.R., 1995. A synthetic inhibitor of the mitogen-activated protein kinase cascade. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* **15;92**(17):7686-9.

Duellberg C., Trokter M., Jha R., Sen I., Steinmetz M.O., Surrey T., 2014. Reconstitution of a hierarchical +TIP interaction network controlling microtubule end tracking of dynein. *Nat. Cell Biol.* **16**(8):804-11.

Dujardin D., Wacker U.I., Moreau A., Schroer T.A., Rickard J.E., De Mey J.R., 1998. Evidence for a role of CLIP-170 in the establishment of metaphase chromosome alignment. *J. Cell Biol.* **18;141**(4):849-62.

Dumontet C. & Jordan M.A., 2010. Microtubule-binding agents: a dynamic field of cancer therapeutics. *Nat. Rev. Drug Discov.* **9**(10):790-803.

Dunn S., Morrison E.E., Liverpool T.B., Molina-París C., Cross R.A., Alonso M.C., Peckham M., 2008. Differential trafficking of Kif5c on tyrosinated and detyrosinated microtubules in live cells. *J. Cell Sci.* **1;121**(Pt 7):1085-95.

Dunsch A.K., Linnane E., Barr F.A., Gruneberg U., 2011. The astrin-kinastrin/SKAP complex localizes to microtubule plus ends and facilitates chromosome alignment. *J. Cell Biol.* **21;192**(6):959-68.

Dutcher S.K., 2001. The tubulin fraternity: alpha to eta. *Curr. Opin. Cell Biol.* **13**(1):49-54.

Dzhinzhev N.S., Rogers S.L., Vale R.D., Ohkura H., 2005. Distinct mechanisms govern the localization of Drosophila CLIP-190 to unattached kinetochores and microtubule plus-ends. *J. Cell Sci.* **15;118**(Pt 16):3781-90.

E

Ebneth A., Drewes G., Mandelkow E.M., Mandelkow E., 1999. Phosphorylation of MAP2c and MAP4 by MARK kinases leads to the destabilization of microtubules in cells. *Cell Motil. Cytoskeleton.* **44**(3):209-24.

Echarri A. and Del Pozo M.A., 2015. Caveolae – mechanosensitive membrane invaginations linked to actin filaments. *J. Cell Sci.* **1;128**(15):2747-58.

Eddé B., Rossier J., Le Caer J.P., Desbruyères E., Gros F., Denoulet P., 1990. Posttranslational glutamylation of alpha-tubulin. *Science.* **5;247**(4938):83-5.

Efimov A., Kharitonov A., Efimova N., Loncarek J., Miller P.M., Andreyeva N., Gleeson P., Galjart N., Maia A.R., McLeod I.X., Yates J.R. 3rd., Maiato H., Khodjakov A., Akhmanova A., Kaverina I., 2007. Asymmetric CLASP-dependent nucleation of noncentrosomal microtubules at the trans-Golgi network. *Dev. Cell.* **12**(6):917-30.

Efimov A., Schiefermeier N., Grigoriev I., Ohi R., Brown M.C., Turner C.E., Kaverina I., **2008**. Paxillin-dependent stimulation of microtubule catastrophes at focal adhesion sites. *J. Cell Sci.* 15;**121**(Pt 2):196-204.

Efimov V.P., Zhang J., Xiang X., **2006**. CLIP-170 homologue and NUDE play overlapping roles in NUDF localization in *Aspergillus nidulans*. *Mol. Biol. Cell.* **17**(4):2021-34.

Eipper B.A., **1972**. Rat brain microtubule protein: purification and determination of covalently bound phosphate and carbohydrate. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* **69**(8):2283-7.

Elie-Caille C., Severin F., Helenius J., Howard J., Muller D.J., Hyman A.A., **2007**. Straight GDP-tubulin protofilaments form in the presence of taxol. *Curr. Biol.* **23**;17(20):1765-70.

Enomoto A., Suzuki N., Morita A., Ito M., Liu C.Q., Matsumoto Y., Yoshioka K., Shiba T., Hosoi Y., **2003**. Caspase-mediated cleavage of JNK during stress-induced apoptosis. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* **11**;306(4):837-42.

Erck C., Peris L., Andrieux A., Meissirel C., Gruber A.D., Vernet M., Schweitzer A., Saudi Y., Pointu H., Bosc C., Salin P.A., Job D., Wehland J., **2005**. A vital role of tubulin-tyrosine-ligase for neuronal organization. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* **31**;102(22):7853-8.

Ersfeld K., Wehland J., Plessmann U., Dodemont H., Gerke V., Weber K., **1993**. Characterization of the tubulin-tyrosine ligase. *J. Cell Biol.* **120**(3):725-32.

Etienne-Manneville S. and Hall A., **2003**. Cdc42 regulates GSK-3beta and adenomatous polyposis coli to control cell polarity. *Nature.* **13**;421(6924):753-6.

F

Faruki S., Geahlen R.L., Asai D.J., **2000**. Syk-dependent phosphorylation of microtubules in activated B-lymphocytes. *J. Cell Sci.* **113**(Pt 14):2557-65.

Favata M.F., Horiuchi K.Y., Manos E.J., Daulerio A.J., Stradley D.A., Feeser W.S., Van Dyk D.E., Pitts W.J., Earl R.A., Hobbs F., Copeland R.A., Magolda R.L., Scherle P.A., Trzaskos J.M., **1998**. Identification of a novel inhibitor of mitogen-activated protein kinase kinase. *J. Biol. Chem.* **17**;273(29):18623-32.

Feierbach B., Verde F., Chang F., **2004**. Regulation of a formin complex by the microtubule plus end protein tealp. *J. Cell Biol.* **7**;165(5):697-707.

Ferreira J.G., Pereira A.J., Akhmanova A., Maiato H., **2013**. Aurora B spatially regulates EB3 phosphorylation to coordinate daughter cell adhesion with cytokinesis. *J. Cell Biol.* **27**;201(5):709-24.

Ferreira J.G., Pereira A.L., Maiato H., **2014**. Microtubule plus-end tracking proteins and their roles in cell division. *Int. Rev. Cell Mol. Biol.* **309**:59-140.

Field C.M. & Kellogg D., **1999**. Septins: cytoskeletal polymers or signaling GTPases? *Trends Cell Biol.* **9**(10):387-94.

Fischer R.S. and Fowler V.M., **2015**. Thematic minireview series: the state of the cytoskeleton in 2015. *J. Biol. Chem.* **10**;290(28):17133-6.

Fletcher D.A. and Mullins R.D., **2010**. Cell mechanics and the cytoskeleton. *Nature.* **18**;463(7280):485-92.

Folker E.S., Baker B.M., 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**(11):5373-84.

Fourest-Lieuvin A., Peris L., Gache V., Garcia-Saez I., Juillan-Binard C., Lantéz V., Job D., **2006**. Microtubule regulation in mitosis: tubulin phosphorylation by the cyclin-dependent kinase Cdk1. *Mol. Biol. Cell.* **17**(3): 1041-50.

Fourniol F., Perderiset M., Houdusse A., Moores C., **2013**. Structural studies of the doublecortin family of MAPs. *Methods Cell Biol.* **115**:27-48.

Franker M.A. and Hoogenraad C.C., **2013**. Microtubule-based transport – basic mechanisms, traffic rules and role in neurological pathogenesis. *J. Cell Sci.* **126**(Pt 11):2319-29.

Freshney N.W., Rawlinson L., Guesdon F., Jones E., Cowley S., Hsuan J., Saklatvala J., **1994**. Interleukin-1 activates a novel protein kinase cascade that results in the phosphorylation of Hsp27. *Cell.* **78**(6):1039-49.

Froidevaux-Klipfel L., Targa B., Cantaloube I., Ahmed-Zaid H., Poüs C., Baillet A., **2015**. Septin cooperation with tubulin polyglutamylation contributes to cancer cell adaptation to taxanes. *Oncotarget.* **6**(34):36063-80.

Fu M.M. and Holzbaur E.L., **2014**. Integrated regulation of motor-driven organelle transport by scaffolding proteins. *Trends. Cell Biol.* **24**(10):564-74.

Fujita S., Pytela J., Hotta T., Kato T., Hamada T., Akamatsu R., Ishida Y., Kutsuna N., Hasezawa S., Nomura Y., Nakagami H., Hashimoto T., **2013**. An atypical tubulin kinase mediates stress-induced microtubule depolymerization in Arabidopsis. *Curr. Biol.* **23**(20):1969-78.

Fukata M., Kuroda S., Fujii K., Nakamura T., Shoji I., Matsuura Y., Okawa K., Iwamatsu A., Kikuchi A., Kaibuchi K., **1997**. Regulation of cross-linking of actin filament by IQGAP1, a target for Cdc42. *J. Biol. Chem.* **272**(47):29579-83.

Fukata M., Watanabe T., Noritake J., Nakagawa M., Yamaga M., Kuroda S., Matsuura Y., Iwamatsu A., Perez F., Kaibuchi K., **2002**. Rac1 and Cdc42 capture microtubules through IQGAP1 and CLIP-170. *Cell.* **109**(7):873-85.

G

Gadahar S., Bodakuntla S., Natarajan K., Janke C., **2017**. The tubulin code at a glance. *J. Cell Sci.* **130**(8):1347-53.

Galjart N., **2005**. CLIPs and CLASPs and cellular dynamics. *Nat. Rev. Mol. Cell Biol.* **6**(6):487-98.

Galjart N., **2010**. Plus-end-tracking proteins and their interactions at microtubule ends. *Curr. Biol.* **20**(12):R528-37.

Galjart N. and Perez F., **2003**. A plus-end raft to control microtubule dynamics and function. *Curr. Opin. Cell Biol.* **15**(1):48-53.

Gandalovičová A., Vomastek T., Rosel D., Brábek J., **2016**. Cell polarity signaling in the plasticity of cancer cell invasiveness. *Oncotarget.* **7**(18):25022-49.

Gandhi R., Bonaccorsi S., Wentworth D., Doxsey S., Gatti M., Pereira A., **2004**. The Drosophila kinesin-like protein KLP67 is essential for mitotic and male meiotic spindle assembly. *Mol. Biol. Cell.* **15**(1):121-31.

Gao F.J., Hebbar S., Gao X.A., Alexander M., Pandey J.P., Walla M.D., Cotham W.E., King S.J., Smith D.S., **2015**. GSK-3 β phosphorylation of cytoplasmic dynein reduces Ndel1 binding to intermediate chains and alters dynein motility. *Traffic.* **16**(9):941-61.

- Gao F.J., Shi L., Hines T., Hebbar S., Neufeld K.L., Smith D.S., 2017.** Insulin signaling regulates a functional interaction between adenomatous polyposis coli and cytoplasmic dynein. *Mol. Biol. Cell.* 1;**28**(5):587-599.
- Gao J., Huo L., Sun X., Liu M., Li D., Dong J.T., Zhou J., 2008.** The tumor suppressor CYLD regulates microtubule dynamics and plays a role in cell migration. *J. Biol. Chem.* 4;**283**(14):8802-9.
- Garai A., Zeke A., Gógl G., Törő I., Fördös F., Blankenburg H., Bárkai T., Varga J., Alexa A., Emig D., Albrecht M., Reményi A., 2012.** Specificity of linear motifs that bind to a common mitogen-activated protein kinase docking groove. *Sci. Signal.* 9;**5**(245):ra74.
- Gard D.L. and Kirschner M.W., 1985.** A polymer-dependent increase in phosphorylation of beta-tubulin accompanies differentiation of a mouse neuroblastoma cell line. *J. Cell Biol.* **100**(3):764-74.
- Gard D.L. and Kirschner M.W., 1987.** A microtubule-associated protein from *Xenopus* eggs that specifically promotes assembly at the plus-end. *J. Cell Biol.* **105**(5):2203-15.
- Gardiner J., Overall R., Marc J., 2011.** Putative Arabidopsis homologues of metazoan coiled-coil cytoskeletal proteins. *Cell Biol. Int.* **35**(8):767-74.
- Gardner M.K., Zanic M., Gell C., Bormuth V., Howard J., 2011.** Depolymerizing kinesins Kip3 and MCAK shape cellular microtubule architecture by differential control of catastrophe. *Cell.* 23;**147**(5):1092-103.
- Gardner M.K., Zanic M., Howard J., 2013.** Microtubule catastrophe and rescue. *Curr Opin Cell Biol.* **25**(1):14-22.
- Garnham C.P. and Roll-Mecak A., 2012.** The chemical complexity of cellular microtubules: tubulin post-translational modification enzymes and their roles in tuning microtubule functions. *Cytoskeleton (Hoboken).* **69**(7):442-63.
- Gdalyahu A., Ghosh I., Levy T., Sapir T., Sapoznik S., Fishler Y., Azoulay D., Reiner O., 2004.** DCX, a new mediator of the JNK pathway. *EMBO J.* 25;**23**(4):823-32.
- Geeraert C., Ratier A., Pfisterer S.G., Perdiz D., Cantaloube I., Rouault A., Pattingre S., Proikas-Cezanne T., Codogno P., Poüs C., 2010.** Starvation-induced hyperacetylation of tubulin is required for the stimulation of autophagy by nutrient deprivation. *J. Biol. Chem.* 30;**285**(31):24184-94.
- Gehring M., Muth F., Koch P., Laufer S.A., 2015.** C-Jun N-terminal kinase inhibitors: a patent review (2010-2014). *Expert Opin. Ther. Pat.* **25**(8):849-72.
- Geiser J.R., Schott E.J., Kingsbury T.J., Cole N.B., Totis L.J., Bhattacharyya G., He L., Hoyt M.A., 1997.** *Saccharomyces cerevisiae* genes required in the absence of the CIN8-encoded spindle motor act in functionally diverse mitotic pathways. *Mol. Biol. Cell.* **8**(6):1035-50.
- Giraudel A., Lafanechère L., Ronjat M., Wehland J., Garel J.R., Wilson L., Job D., 1998.** Separation of tubulin subunits under nondenaturing conditions. *Biochemistry.* 16;**37**(24):8724-34.
- Gittes F., Mickey B., Nettleton J., Howard J., 1993.** Flexural rigidity of microtubules and actin filaments measured from thermal fluctuations in shape. *J. Cell Biol.* **120**(4):923-34.
- Giustiniani J., Daire V., Cantaloube I., Durand G., Poüs C., Perdiz D., Baillet A., 2009.** Tubulin acetylation favors Hsp90 recruitment to microtubules and stimulates the signaling function of the Hsp90 clients Akt/PKB and p53. *Cell Signal.* **21**(4):529-39.
- 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., Walsh C.A., 1998.** Doublecortin, a brain-specific gene mutated in

human X-linked lissencephaly and double cortex syndrome, encodes a putative signaling protein. *Cell*. 9;**92**(1):63-72.

Goldspink D.A., Rookyard C., Tyrrell B.J., Gadsby J., Perkins J., Lund E.K., Galjart N., Thomas P., Wileman T., Mogensen M.M., **2017**. Ninein is essential for apico-basal microtubule formation and CLIP-170 facilitates its redeployment to non-centrosomal microtubule organizing centres. *Open. Biol.* 7(2).pii:160274.

Goldstone S., Reyes C., Gay G., Courthéoux T., Dubarry M., Tournier S., Gachet Y., **2010**. Tip1/CLIP-170 protein is required for correct chromosome poleward movement in fission yeast. *PLoS One*. 13;**5**(5):e10634.

Gönczy P., Bellanger J.M., Kirkham M., Pozniakowski A., Baumer K., Phillips J.B., Hyman A.A., **2001**. Zyg-8, a gene required for spindle positioning in *C. elegans*, encodes a doublecortin related kinase that promotes microtubule assembly. *Dev. Cell*. 1(3):363-75.

Gong F.R., Wu M.Y., Shen M., Zhi Q., Wang R., Wang W.J., Zong Y., Li Z.L., Wu Y., Zhou B.P., Chen K., Tao M., Li W., **2015**. PP2A inhibitors arrest G2/M transition through JNK/Sp1-dependent down-regulation of CDK1 and autophagy-dependent up-regulation of p21. *Oncotarget*. 30;**6**(21):18469-83.

Goode B.L., Denis P.E., Panda D., Radeke M.J., Miller H.P., Wilson L., Feinstein S.C., **1997**. Functional interactions between the proline-rich and repeat regions of tau enhance microtubule binding and assembly. *Mol. Biol. Cell*. 8(2):353-65.

Goodson H.V., Skube S.B., Stalder R., Valetti C., Kreis T.E., Morrison E.E., Schroer T.A., **2003**. CLIP-170 interacts with dynactin complex and the APC-binding protein EB1 by different mechanisms. *Cell Motil. Cytoskeleton*. 55(3):156-73.

Gouveia S.M. and Akhmanova A., **2010**. Cell and molecular biology of microtubule plus end tracking proteins: end binding proteins and their partners. *Int. Rev. Cell Mol. Biol.* 285:1-74.

Grigoriev I., Gouveia S.M., van der Vaart B., Demmers J., Smyth J.T., Honnappa S., Splinter S., Steinmetz M.O., Putney J.W Jr., Hoogenraad C.C., Akhmanova A., **2008**. STIM1 is a MT-plus-end-tracking protein involved in remodeling of the ER. *Curr. Biol.* 12;**18**(3):177-82.

Grimaldi A.D., Maki T., Fitton B.P., Roth D., Yampolsky D., Davidson M.W., Svitkina T., Straube A., Hayashi I., Kaverina I., **2014**. CLASPs are required for proper microtubule localization of end-binding proteins. *Dev. Cell*. 11;**30**(3):343-52.

Grimaldi A.D., Zanic M., Kaverina I., **2015**. Encoding the microtubule structure: Allosteric interactions between the microtubule +TIP complex master regulators and TOG-domain proteins. *Cell Cycle*. 14(9):1375-8.

Griparic L. and Keller T.C. 3rd, **1998**. Identification and expression of two novel CLIP-170/Restin isoforms expressed predominantly in muscle. *Biochim. Biophys. Acta*. 21;**1405**(1-3):35-46.

Griparic L. and Keller T.C. 3rd, **1999**. Differential usage of two 5' splice sites in a complex exon generates additional protein sequence complexity in chicken CLIP-170 isoforms. *Biochim. Biophys. Acta*. 8;**1449**(2):119-24.

Griparic L., Volosky J.M., Keller T.C. 3rd, **1998**. Cloning and expression of chicken CLIP-170 and restin isoforms. *Gene*. 12;**206**(2):195-208.

Grohmann A., Tanneberger K., Alzner A., Schneikert J., Behrens J., **2007**. AMER1 regulates the distribution of the tumor suppressor APC between microtubules and the plasma membrane. *J. Cell Sci.* 1;**120**(Pt 21):3738-47.

Gundersen G.G. and Cook T.A., **1999**. Microtubules and signal transduction. *Curr. Opin. Cell Biol.* **11**(1):81-94.

Gundersen G.G., Gomes E.R., Wen Y., **2004**. Cortical control of microtubule stability and polarization. *Curr. Opin. Cell Biol.* **16**(1):106-12.

Guo Y., Kim C., Mao Y., **2013**. New insights into the mechanism for chromosome alignment in metaphase. *Int. Rev. Cell Mol. Biol.* **303**:237-62.

Gupta J. and Nebreda A.R., **2015**. Roles of p38a mitogen-activated protein kinase in mouse models of inflammatory diseases and cancer. *FEBS J.* **282**(10):1841-57.

Gupta K.K., Alberico E.O., Näthke I.S., Goodson H.V., **2014**. Promoting microtubule assembly: A hypothesis for the functional significance of the +TIP network. *Bioessays.* **36**(9):818-26.

Gupta K.K., Joyce M.V., Slabbekoorn A.R., Zhu Z.C., Paulson B.A., Goodson H.V., **2010**. Probing interactions between CLIP-170, EB1, and microtubules. *J. Mol. Biol.* **5**;395(5):1049-62.

Gupta K.K., Paulson B.A., Folker E.S., Charlebois B., Hunt A.J., Goodson H.V., **2009**. Minimal plus-end tracking unit of the cytoplasmic linker protein CLIP-170. *J. Biol. Chem.* **13**;284(11):6735-42.

Gupta M.L. Jr. Carvalho P., Roof D.M., Pellman D., **2006**. Plus end-specific depolymerase activity of Kip3, a kinesin-8 protein, explains its role in positioning the yeast mitotic spindle. *Nat. Cell Biol.* **8**(9):913-23.

Gupta S., Barrett T., Whitmarsh A.J., Cavanagh J., Sluss H.K., Dérijard B., Davis R.J., **1996**. Selective interaction of JNK protein kinase isoforms with transcription factors. *EMBO J.* **3**;15(11):2760-70.

Gustke N., Trinczek B., Biernat J., Mandelkow E.M., Mandelkow E., **1994**. Domains of tau protein and interactions with microtubules. *Biochemistry.* **16**;32(32):9511-22.

Gutierrez G.J., Tsuji T., Cross J.V., Davis R.J., Templeton D.J., Jiang W., Ronai Z.A., **2010**. JNK-mediated phosphorylation of Cdc25C regulates cell cycle entry and G(2)/M DNA damage checkpoint. *J. Biol. Chem.* **7**;285(19):14217-28.

H

Häfner J., Mayr M.I., Möckel M.M., Mayer T.U., **2014**. Pre-anaphase chromosome oscillations are regulated by the antagonistic activities of Cdk1 and PP1 on Kif18A. *Nat. Commun.* **22**;5:4397.

Hallak M.E., Rodriguez J.A., Barra H.S., Caputto R., **1977**. Release of tyrosine from tyrosinated tubulin. Some common factors that affect this process and the assembly of tubulin. *FEBS Lett.* **1**;73(2):147-50.

Halpain S. and Dehmelt L., **2006**. The MAP1 family of microtubule-associated proteins. *Genome Biol.* **7**(6):224.

Han J., Lee J.D., Bibbs L., Ulevitch R.J., **1994**. A MAP kinase targeted by endotoxin and hyperosmolarity in mammalian cells. *Science.* **5**;265(5173):808-11.

Hanks S.K. and Hunter T., **1995**. Protein kinases 6. The eukaryotic protein kinase superfamily: kinase (catalytic) domain structure and classification. *FASEB J.* **9**(8):576-96.

Hanks S.K., Quinn A.M., Hunter T., **1988**. The protein kinase family: conserved features and deduced phylogeny of the catalytic domains. *Science.* **1**;241(4861):42-52.

- Hannak E.** and Heald R., **2006**. Xorbit/CLASP links dynamic microtubules to chromosomes in the *Xenopus* meiotic spindle. *J. Cell Biol.* 2;**172**(1):19-25.
- Harada A.**, Takei Y., Kanai Y., Tanaka Y., Nonaka S., Hirokawa N., **1998**. Golgi vesiculation and lysosome dispersion in cells lacking cytoplasmic dynein. *J. Cell Biol.* 6;**141**(1):51-9.
- Hardin**, Bertoni and Kleinsmith, **2012**. Principles of cell biology (BIOL2060). Department of Biology - Memorial University of Newfoundland. *Becker's World of the Cell, 8th edition*. Pearson Education Inc. (<http://www.mun.ca/biology/desmid/brian/BIOL2060/BIOL2060-15/CB15.html>).
- Harper S.J.** and Wilkie N., **2003**. MAPKs: new targets for neurodegeneration. *Expert. Opin. Ther. Targets.* 7(2):187-200.
- Hart M.J.**, Callow M.G., Souza B., Polakis P., **1996**. IQGAP1, a calmodulin-binding protein with a rasGAP-related domain, is a potential effector for cdc42Hs. *EMBO J.* 17;**15**(12):2997-3005.
- Hashimoto T.**, 2015. Microtubules in plants. *Arabidopsis Book.* **13**:e0179
- Hayashi I.** and Ikura M., **2003**. Crystal structure of the amino-terminal microtubule-binding domain of end-binding protein 1 (EB1). *J. Biol. Chem.* 19;**278**(38):36430-4.
- Hayashi I.**, Plevin M.J., Ikura M., **2007**. CLIP170 autoinhibition mimics intermolecular interaction with p150Glued or EB1. *Nat. Struct. Mol. Biol.* **14**(10):980-1.
- Hazan J.**, Fonknechten N., Mavel D., Paternotte C., Samson D., Artiguenave F., Davoine C.S., Cruaud C., Dürr A., Wincker P., Brottier P., Cattolico L., Barbe V., Burgunder J.M., Prud'homme J.F., Brice A., Fontaine B., Heilig B., Weissenbach J., **1999**. Spastin, a new AAA protein, is altered in the most frequent form of autosomal dominant spastic paraplegia. *Nat. Genet.* **23**(3):296-303.
- He M.**, Subramanian R., Bangs F., Omelchenko T., Liem K.F. Jr. Kapoor T.M., Anderson K.V., **2014**. The kinesin-4 protein Kif7 regulates mammalian Hedgehog signalling by organizing the cilium tip compartment. *Nat. Cell Biol.* **16**(7):663-72.
- 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.* 22;**111**(16):5860-5.
- Hendricks A.G.**, Lazarus J.E., Perlson E., Gardner M.K., Odde D.J., Goldman Y.E., Holzbaur E.L., **2012**. Dynein tethers and stabilizes dynamic microtubule plus ends. *Curr. Biol.* 10;**22**(7):632-7.
- Henty-Ridilla J.L.**, Rankova A., Eskin J.A., Kenny K., Goode B.L., **2016**. Accelerated actin filament polymerization from microtubule plus ends. *Science.* 20;**352**(6288):1004-9.
- Heo Y.S.**, Kim S.K., Seo C.I., Kim Y.K., Sung B.J., Lee H.S., Lee J.I., Park S.Y., Kim J.H., Hwang K.Y., Hyun Y.L., Jeon Y.H., Ro S., Cho J.M., Lee T.G., Yang C.H., **2004**. Structural basis for the selective inhibition of JNK1 by the scaffolding protein JIP1 and SP600125. *EMBO J.* **23**(11):2185-95.
- Hernandez P.** and Tirnauer J.S., **2010**. Tumor suppressor interactions with microtubules: keeping cell polarity and cell division on track. *Dis. Model Mech.* **3**(5-6):304-15.
- Hibi M.**, Lin A., Smeal T., Minden A., Karin M., **1993**. Identification of an oncoprotein- and UV-responsive protein kinase that binds and potentiates the c-Jun activation domain. *Genes Dev.* 7(11):2135-48.
- Hildesheim J.**, Bulavin D.V., Anver M.R., Alvord W.G., Hollander M.C., Vardanian L., Fornace A.J., Jr. **2002**. Gadd45a protects against UV irradiation-induced skin tumors, and promotes apoptosis and stress signaling via MAPK and p53. *Cancer Res.* 15;**62**(24):7305-15.

- Hino M.**, Kijima-Suda I., Nagai Y., Hosova H., **2003**. Glycosylation of the alpha and beta tubulin by sialyloligosaccharides. *Zoolog. Sci.* **20**(6):709-15.
- Hirokawa N.** and Noda Y., **2008**. Intracellular transport and kinesin superfamily proteins, KIFs: structure, function, and dynamics. *Physiol. Rev.* **88**(3):1089-118.
- Hirokawa N.**, Noda Y., Tanaka Y., Niwa S., **2009**. Kinesin superfamily motor proteins and intracellular transport. *Nat. Rev. Mol. Cell Biol.* **10**(10):682-96.
- Hirose K.**, Fan J., Amos L.A., **1995**. Re-examination of the polarity of microtubules and sheets decorated with kinesin motor domain. *J. Mol. Biol.* **18**;251(3):329-33.
- Hirosumi J.**, Tuncman G., Chang L., Görgün C.Z., Uysal K.T., Maeda K., Karin M., Hotamisligil G.S., **2002**. A central role for JNK in obesity and insulin resistance. *Nature.* **21**;420(6913):333-6.
- Hollenbeck P.J.**, **1993**. Phosphorylation of neuronal kinesin heavy and light chains in vivo. *J. Neurochem.* **60**(6):2265-75.
- Honnappa S.**, Gouveia S.M., Weisbrich A., Damberger F.F., Bhavesh N.S., Jawhari H., Grigoriev I., van Rijssel F.J., Buey R.M., Lawera A., Jelesarov I., Winkler F.K., Wüthrich K., Akhmanova A., Steinmetz M.O., **2009**. An EB1-binding motif acts as a microtubule tip localization signal. *Cell.* **23**;138(2):366-76.
- Honnappa S.**, John C.M., Kostrewa D., Winkler F.K., Steinmetz M.O., **2005**. Structural insights into the EB1-APC interaction. *EMBO J.* **26**;24(2):261-9.
- Honnappa S.**, Okhrimenko O., Jaussi R., Jawhari H., Jelesarov I., Winkler F.K., Steinmetz M.O., **2006**. Key interaction modes of dynamic +TIP networks. *Mol. Cell.* **1**;23(5):663-71.
- Hoogenraad C.C.**, Akhmanova A., Galjart N., De Zeeuw C.I., **2004**. LIMK1 and CLIP-115: linking cytoskeletal defects to Williams syndrome. *Bioessays.* **26**(2):141-50.
- Hoogenraad C.C.**, Akhmanova A., Grosveld F., De Zeeuw C.I., Galjart N., **2000**. Functional analysis of CLIP-115 and its binding to microtubules. *J. Cell Sci.* **113**(Pt 12):2285-97.
- Hoogenraad C.C.**, Akhmanova A., Howell S.A., Dortland B.R., De Zeeuw C.I., Willemsen R., Visser P., Grosveld F., Galjart N., **2001**. Mammalian Golgi-associated Bicaudal-D2 functions in the dynein-dynactin pathway by interacting with these complexes. *EMBO J.* **1**;20(15):4041-54.
- Hoogenraad C.C.**, Koekkoek B., Akhmanova A., Krugers H., Dortland B., Miedema M., van Alphen A., Kistler W.M., Jaegle M., Koutsourakis M., Van Camp N., Verhoye M., van der Linden A., Kaverina I., Grosveld F., De Zeeuw C.I., Galjart N., **2002**. Targeted mutation of Cyln2 in the Williams syndrome critical region links CLIP-115 haploinsufficiency to neurodevelopmental abnormalities in mice. *Nat. Genet.* **32**(1):116-27.
- Horiuchi D.**, Collins C.A., Bhat P., Barkus R.V., Diantonio A., Saxton W.M., **2007**. Control of a kinesin-cargo linkage mechanism by JNK pathway kinases. *Curr. Biol.* **7**;17(15):1313-7.
- Hoshi M.**, Ohta K., Gotoh Y., Mori A., Murofushi H., Sakai H., Nishida E., **1992**. Mitogen-activated-protein-kinase-catalyzed phosphorylation of microtubule-associated proteins, microtubule-associated protein 2 and microtubule-associated protein 4, induces an alteration in their function. *Eur. J. Biochem.* **15**;203(1-2):43-52.
- Hotamisligil G.S.** and Davis R.J., **2016**. Cell signaling and stress responses. *Cold. Spring Harb. Perspect. Biol.* **3**;8(10):1-20.
- Houlden H.**, Johnson J., Gardner-Thorpe C., Lashley T., Hernandez D., Worth P., Singleton A.B., Hilton D.A., Holton J., Revesz T., Davis M.B., Giunti P., Wood N.W., **2007**. Mutations in TTBK2,

encoding a kinase implicated in tau phosphorylation, segregate with spinocerebellar ataxia type 11. *Nat. Genet.* **39**(12):1434-6.

Howard J. and Hyman A.A., **2003**. Dynamics and mechanics of the microtubule plus end. *Nature.* **422**(6933):753-58.

Howard J. and Hyman A.A., **2007**. Microtubule polymerases and depolymerases. *Curr. Opin. Cell Biol.* **19**(1):31-5.

Howard J. and Hyman A.A., **2009**. Growth, fluctuation and switching at microtubule plus ends. *Nat. Rev. Mol. Cell Biol.* **10**(8):569-74.

Howell B., Deacon H., Cassimeris L., **1999**. Decreasing oncoprotein 18/stathmin levels reduces microtubule catastrophes and increases microtubule polymer in vivo. *J. Cell Sci.* **112**(Pt 21):3713-22.

Hsu P.P., Kang S.A., Rameseder J., Zhang Y., Ottina K.A., Lim D., Peterson T.R., Choi Y., Gray N.S., Yaffe M.B., Marto J.A., Sabatini D.M., **2011**. The mTOR-regulated phosphoproteome reveals a mechanism of mTORC1-mediated inhibition of growth factor signaling. *Science.* **332**(6035):1317-22.

Hsu S.H., Schacter B.Z., Delaney N.L., Miller T.B., McKusick V.A., Kennett R.H., Bodmer J.G., Young D., Bodmer W.F., **1976**. Genetic characteristics of the HeLa cell. *Science.* **191**:392-394.

Hu D.J., Baffet A.D., Nayak T., Akhmanova A., Doye V., Vallee R.B., **2013**. Dynein recruitment to nuclear pores activates apical nuclear migration and mitotic entry in brain progenitor cells. *Cell.* **154**(6):1300-13.

Huang C., Jacobson K., Schaller M.D., **2004**. MAP kinases and cell migration. *J. Cell Sci.* **117**(Pt 20):4619-28.

Huang C., Rajfur Z., Borchers C., Schaller M.D., Jacobson K., **2003**. JNK phosphorylates paxillin and regulates cell migration. *Nature.* **424**(6945):219-23.

Huang K., Diener D.R., Rosenbaum J.L., **2009**. The ubiquitin conjugation system is involved in the disassembly of cilia and flagella. *J. Cell Biol.* **186**(4):601-13.

Huang Q., Du X., He X., Yu Q., Hu K., Breitwieser W., Shen Q., Ma S., Li M., **2016**. JNK-mediated activation of ATF2 contributes to dopaminergic neurodegeneration in the MPTP mouse model of Parkinson's disease. *Exp. Neurol.* **277**:296-304.

Hubbert C., Guardiola A., Shao R., Kawaguchi Y., Ito A., Nixon A., Yoshida M., Wang X.F., Yao T.P., **2002**. HDAC6 is a microtubule-associated deacetylase. *Nature.* **417**(6887):455-8.

Hunter A.W., Caplow M., Coy D.L., Hancock W.O., Diez S., Wordeman L., Howard J., **2003**. The kinesin-related protein MCAK is a microtubule depolymerase that forms an ATP-hydrolyzing complex at microtubule ends. *Mol. Cell.* **11**(2):445-57.

Hyman A.A., Salser S., Drechsel D.N., Unwin N., Mitchison T.J., **1992**. Role of GTP hydrolysis in microtubule dynamics: information from a slowly hydrolysable analogue, GMPCPP. *Mol. Biol. Cell.* **3**(10):1155-67.

Hyman A., Karsenti E., **1998**. The role of nucleation in patterning microtubule networks. *J. Cell Sci.* **111**(Pt 15):2077-83.

I

- Iftode F., Clérot J.C., Levilliers N., Bré M.H., 2000.** Tubulin polyglycylation: a morphogenetic marker in ciliates. *Biol. Cell.* **92**(8-9):615-28.
- Iida N., Fujita M., Miyazawa K., Kobayashi M., Hattori S., 2014.** Proteomic identification of p38 MAP kinase substrates using in vitro phosphorylation. *Electrophoresis.* **35**(4):554-62.
- Ikegami K. and Setou M., 2009.** TTLL10 can perform tubulin glycylation when co-expressed with TTLL8. *FEBS Lett.* **583**(12):1957-63.
- Ikegami K. and Setou M., 2010.** Unique post-translational modifications in specialized microtubule architecture. *Cell Struct. Funct.* **35**(1):15-22.
- Ikegami K., Heier R.L., Taruishi M., Takagi H., Mukai M., Shimma S., Taira S., Hatanaka K., Morone N., Yao I., Campbell P.K., Yuasa S., Janke C., Macgregor G.R., Setou M., 2007.** Loss of alpha-tubulin polyglutamylase in ROSA22 mice is associated with abnormal targeting of KIF1A and modulated synaptic function. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* **104**(9):3213-8.
- Ikegami K., Mukai M., Tsuchida J., Heier R.L., Macgregor G.R., Setou M., 2006.** TTLL7 is a mammalian beta-tubulin polyglutamylase required for growth of MAP2-positive neurites. *J. Biol. Chem.* **281**(41):30707-16.
- Ikegami K., Sato S., Nakamura K., Ostrowski L.E., Setou M., 2010.** Tubulin polyglutamylase is essential for airway ciliary function through the regulation of beating asymmetry. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* **107**(23):10490-5.
- Imamura K., Kon T., Ohkura R., Sutoh K., 2007.** The coordination of cyclic microtubule association/dissociation and tail swing of cytoplasmic dynein. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* **104**(41):16134-9.
- Imanishi M., Endres N.F., Gennerich A., Vale R.D., 2006.** Autoinhibition regulates the motility of the *C. elegans* intraflagellar transport motor OSM-3. *J. Cell Biol.* **174**(7):931-7.
- Inoué S., 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**(6):Suppl:259-92.
- Inoue Y.H., do Carmo Avides M., Shiraki M., Deak P., Yamaguchi M., Nishimoto Y., Matsukage A., Glover D.M., 2000.** Orbit, a novel microtubule-associated protein essential for mitosis in *Drosophila melanogaster*. *J. Cell. Biol.* **149**(1):153-66.
- Isshiki K., Hirase T., Matsuda S., Miyamoto K., Tsuji A., Yuasa K., 2015.** Death-associated protein kinase 2 mediates nocodazole-induced apoptosis through interaction with tubulin. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* **468**(1-2):113-8.
- Ito J., Lu R., Nagayasu Y., Yokoyama S., 2014.** Apolipoprotein A-I induces tubulin phosphorylation in association with cholesterol release in fetal rat astrocytes. *Biochim. Biophys. Acta.* **1841**(9):1234-40.
- Iwabata H., Yoshida M., Komatsu Y., 2005.** Proteomic analysis of organ-specific post-translational lysine-acetylation and -methylation in mice by use of anti-acetyllysine and -methyllysine mouse monoclonal antibodies. *Proteomics.* **5**(18):4653-64.

J

Jaarsma D. and Hoogenraad C.C., **2015**. Cytoplasmic dynein and its regulatory proteins in Golgi pathology in nervous system disorders. *Front. Neurosci.* 26;9:397.

Jaffrey S.R., Erdjument-Bromage H., Ferris C.D., Tempst P., Snyder S.H., **2001**. Protein S-nitrosylation: a physiological signal for neuronal nitric oxide. *Nat. Cell Biol.* 3(2):193-7.

Janke C. and Bulinski J.C., **2011**. Post-translational regulation of the microtubule cytoskeleton: mechanisms and functions. *Nat. Rev. Mol. Cell Biol.* 16;12(12):773-86.

Janke C., Rogowski K., Wloga D., Regnard C., Kajava A.V., Strub J.M., Temurak N., van Dijk J., Boucher D., van Dorsselaer A., Suryavanshi S., Gaertig J., Eddé B., **2005**. Tubulin polyglutamylase enzymes are members of the TTL domain protein family. *Science.* 17;308(5729):1758-62.

Jannatipour M. and Rokeach L.A., **1998**. A *Schizosaccharomyces pombe* gene encoding a novel polypeptide with a predicted alpha-helical rod structure found in the myosin and intermediate-filament families of proteins. *Biochim. Biophys. Acta.* 30;1399(1):67-72.

Jha R. and Surrey T., **2015**. Regulation of processive motion and microtubule localization of cytoplasmic dynein. *Biochem. Soc. Trans.* 43(1):48-57.

Jiang K. and Akhmanova A., **2011**. Microtubule tip-interacting proteins: a view from both ends. *Curr. Opin Cell Biol.* 23(1):94-101.

Jiang K., Hua S., Mohan R., Grigoriev I., Yau K.W., Liu Q., Katrukha E.A., Altelaar A.F., Heck A.J., Hoogenraad C.C., Akhmanova A., **2014**. Microtubule minus-end stabilization by polymerization-driven CAMSAP deposition. *Dev. Cell.* 10;28(3):295-309.

Jiang K., Toedt G., Montenegro Gouveia S., Davey N.E., Hua S., van der Vaart B., Grigoriev I., Larsen J., Pedersen L.B., Bezstarosti K., Lince-Faria M., Demmers J., Steinmetz M.O., Gilson T.J., Akhmanova A., **2012**. A proteome-wide screen for mammalian SxIP motif-containing microtubule plus-end tracking proteins. *Curr. Biol.* 9;22(19):1800-7.

Jiang X. and Yeung R.S., **2006**. Regulation of microtubule-dependent protein transport by the TSC2/mammalian target of rapamycin pathway. *Cancer Res.* 15;66(10):5258-69.

Jiang Y., Chen C., Li Z., Guo W., Gegner J. A., Lin S., Han J., **1996**. Characterization of the structure and function of a new mitogen-activated protein kinase (p38beta). *J. Biol. Chem.* 26;271(30): 17920-6.

Jiang Y., Gram H., Zhao M., New L., Gu J., Feng L., Di Padova F., Ulevitch R.J., Han J., **1997**. Characterization of the structure and function of the fourth member of p38 group mitogen-activated protein kinases, p38delta. *J. Biol. Chem.* 28;272(48):30122-8.

Jimbo T., Kawasaki Y., Koyama R., Sato R., Takada S., Haraguchi K., Akiyama T., **2002**. Identification of a link between the tumour suppressor APC and the kinesin superfamily. *Nat. Cell Biol.* 4(4):323-7.

Jin J., Suzuki H., Hirai S., Mikoshiba K., Ohshima T., **2010**. JNK phosphorylates Ser332 of doublecortin and regulates its function in neurite extension and neuronal migration. *Dev. Neurobiol.* 70(14):929-42.

Joglekar A.P. and Kukreja A.A., **2017**. How kinetochores architecture shapes the mechanisms of its function. *Curr. Biol.* 21;27(16):R816-R824.

Jordan M.A. & Wilson L., **2004**. Microtubules as a target for anticancer drugs. *Nat. Rev. Cancer.* 4(4):253-65.

Jourdain L., Curmi P., Sobel A., Pantaloni D., Carlier M.F., **1997**. Stathmin: a tubulin-sequestering protein which forms a ternary T2S complex with two tubulin molecules. *Biochemistry*. 9;**36**(36):10817-21.

Jovasevic V., Naghavi M.H., Walsh D., **2015**. Microtubule plus end-associated CLIP-170 initiates HSV-1 retrograde transport in primary human cells. *J. Cell Biol.* 26;**211**(2):323-37.

K

Kakeno M., Matsuzawa K., Matsui T., Akita H., Sugiyama I., Ishidate F., Nakano A., Takashima S., Goto H., Inagaki M., Kaibuchi K., Watanabe T., **2014**. Plk1 phosphorylates CLIP-170 and regulates its binding to microtubules for chromosome alignment. *Cell Struct. Funct.* **39**(1):45-59.

Kalinina E., Biswas R., Berezniuk I., Hermoso A., Aviles F.X., Fricker L.D., **2007**. A novel subfamily of mouse cytosolic carboxypeptidases. *FASEB J.* **21**(3):836-50.

Kallunki T., Su B., Tsigelny I., Sluss H.K., Dérjard B., Moore G., Davis R., Karin M., **1994**. JNK2 contains a specificity-determining region responsible for efficient c-Jun binding and phosphorylation. *Genes Dev.* 15;**8**(24):2996-3007.

Kang B.S., Hwang Y.J., Dong Z., **2017**. ERK1 directly interacts with JNK1 leading to regulation of JNK1/c-Jun activity and cell transformation. *J. Cell Biochem.* **118**(8):2357-2370.

Karakesisoglou I., Yang Y., Fuchs E., **2000**. An epidermal plakin that integrates actin and microtubule networks at cellular junctions. *J. Cell Biol.* 3;**149**(1):195-208.

Karin M., **2006**. Nuclear factor-kappaB in cancer development and progression. *Nature*. 25;**441**(7092):431-6.

Kaul N., Soppina V., Verhey K.J., **2014**. Effects of α -tubulin K40 acetylation and detyrosination on kinesin-1 motility in a purified system. *Biophys. J.* 17;**106**(12):2636-43.

Kawamura E. and Wasteneys G.O., **2008**. MOR1, the Arabidopsis thaliana homologue of Xenopus MAP215, promotes rapid growth and shrinkage, and suppresses the pausing of microtubules in vivo. *J. Cell Sci.* 15;**121**(Pt 24):4114-23.

Kawasaki M., Hisamoto N., Iino Y., Yamamoto M., Ninomiya-Tsuji J., Matsumoto K., **1999**. A Caenorhabditis elegans JNK signal transduction pathway regulates coordinated movement via type-D GABAergic motor neurons. *EMBO J.* 1;**18**(13):3604-15.

Kawauchi T., Chihama K., Nishimura Y.V., Nabeshima Y., Hoshino M., **2005**. MAP1B phosphorylation is differentially regulated by Cdk5/p35, Cdk5/p25, and JNK. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 27;**331**(1):50-5.

Keays D.A., Tian G., Poirier K., Huang G.J., Siebold C., Cleak J., Olivier P.L., Fray M., Harvey R.J., Molnár Z., Piñón M.C., Dear N., Valdar W., Brown S.D., Davies K.E., Rawlins J.N., Cowan N.J., Nolan P., Chelly J., Flint J., **2007**. Mutations in alpha-tubulin cause abnormal neuronal migration in mice and lissencephaly in humans. *Cell.* 12;**128**(1):45-57.

Kedashiro S., Pastuhov S.I., Nishioka T., Watanabe T., Kaibuchi K., Matsumoto K., Hanafusa H., **2015**. LRRK1-phosphorylated CLIP-170 regulates EGFR trafficking by recruiting p150Glued to microtubule plus ends. *J. Cell Sci.* 15;**128**(2):385-96.

Kelkar N., Gupta S., Dickens M., Davis R.J., **2000**. Interaction of a mitogen-activated protein kinase signaling module with the neuronal protein JIP3. *Mol. Cell Biol.* **20**(3):1030-43.

- Kholmanskikh S.S., Koeller H.B., Wynshaw-Boris A., Gomez T., Letourneau P.C., Ross M.E., 2006.** Calcium-dependent interaction of Lis1 with IQGAP1 and Cdc42 promotes neuronal motility. *Nat. Neurosci.* **9**(1):50-7.
- Khorasanizadeh M., Eskian M., Gelfand E.W., Rezaei N., 2017.** Mitogen-activated protein kinases as therapeutic targets for asthma. *Pharmacol. Ther.* **174**:112-126.
- Kikkawa M., Ishikawa T., Nakata T., Wakabayashi T., Hirokawa N., 1994.** Direct visualization of the microtubule lattice seam both in vitro and in vivo. *J. Cell Biol.* **127**(6 Pt 2):1965-71.
- Kim E.K. and Choi E.J., 2015.** Compromised MAPK signaling in human diseases: an update. *Arch. Toxicol.* **89**(6):867-82.
- Kim L. and Kimmel A.R., 2006.** GSK3 at the edge: regulation of developmental specification and cell polarization. *Curr. Drug Targets.* **7**(11):1411-9.
- Kim M.H., Cooper D.R., Oleksy A., Devedjiev Y., Derewenda U., Reiner O., Otlewski J., Derewenda Z.S., 2004.** The structure of the N-terminal domain of the product of the lissencephaly gene Lis1 and its functional implications. *Structure.* **12**(6):987-98.
- King S.J., Brown C.L., Maier K.C., Quintyne N.J., Schroer T.A., 2003.** Analysis of the dynein-dynactin interaction in vitro and in vivo. *Mol. Biol. Cell.* **14**(12):5089-97.
- Kingston D.G., 2009.** Tubulin-interactive natural products as anticancer agents. *J. Nat. Prod.* **27**:72(3):507-15.
- Kini A.R. and Collins C.A., 2001.** Modulation of cytoplasmic dynein ARPase activity by the accessory subunits. *Cell Motil. Cytoskeleton.* **48**(1):52-60.
- Kinoshita E., and Kinoshita-Kikuta E., 2011.** Improved Phos-tag SDS-PAGE under neutral pH conditions for advanced protein phosphorylation profiling. *Proteomics.* **11**:319-323.
- Kinoshita E., Kinoshita-Kikuta E., Koike T., 2009.** Separation and detection of large phosphoproteins using Phos-tag SDS-PAGE. *Nat. Protoc.* **4**(10):1513-21.
- Kinoshita E., Kinoshita-Kikuta E., Koike T., 2012.** Phos-tag SDS-PAGE systems for phosphorylation profiling of proteins with a wide range of molecular masses under neutral pH conditions. *Proteomics.* **12**:192-202.
- Kinoshita E., Kinoshita-Kikuta E., Takiyama K., Koike T., 2006.** Phosphate-binding tag, a new tool to visualize phosphorylated proteins. *Mol. and Cellular Proteomics.* **5**(4):749-757.
- Kinoshita K., Arnal I., Desai A., Drechsel D.N., Hyman A.A., 2001.** Reconstitution of physiological microtubule dynamics using purified components. *Science.* **9**;294(5545):1340-3.
- Kirschner M.W., 1980.** Implications of treadmilling for the stability and polarity of actin and tubulin polymers in vivo. *J. Cell Biol.* **86**(1):330-4.
- Kita K., Wittmann T., Näthke I.S., Waterman-Storer C.M., 2006.** Adenomatous polyposis coli on microtubule plus ends in cell extensions can promote microtubule net growth with or without EB1. *Mol. Biol. Cell.* **17**(5):2331-45.
- Kobayashi T. and Murayama T., 2009.** Cell cycle-dependent microtubule-based dynamic transport of cytoplasmic dynein in mammalian cells. *PLoS One.* **13**;4(11):e7827.
- Kodama A., Karakesisoglou I., Wong E., Vaezi A., Fuchs E., 2003.** ACF: an essential integrator of microtubule dynamics. *Cell.* **31**;115(3):343-54.

- Kollman** J.M., Merdes A., Mourey L., Agard D.A., **2011**. Microtubule nucleation by γ -tubulin complexes. *Nat. Rev. Mol. Cell Biol.* 12;**12**(11):709-21.
- Kollman** J.M., Polka J.K., Zelter A., Davis T.N., Agard D.A., **2010**. Microtubule nucleating gamma-TuSC assembles structures with 13-fold microtubule-like symmetry. *Nature.* 12;**466**(7308):879-82.
- Komarova** Y., De Groot C.O., Grigoriev I., Gouveia S.M., Munteanu E.L., Schober J.M., Honnappa S., Buey R.M., Hoogenraad C.C., Dogterom M., Borisy G.G., Steinmetz M.O., Akhmanova A., **2009**. Mammalian end binding proteins control persistent microtubule growth. *J. Cell Biol.* 9;**184**(5):691-706.
- Komarova** Y., Lansbergen G., Galjart N., Grosveld F., Borisy G.G., Akhmanova A., **2005**. EB1 and EB3 control CLIP dissociation from the ends of growing microtubules. *Mol. Biol. Cell.* **16**(11):5334-45.
- Komarova** Y.A., Akhmanova A.S., Kojima S., Galjart N., Borisy G.G., **2002a**. Cytoplasmic linker proteins promote microtubule rescue in vivo. *J. Cell Biol.* 25;**159**(4):589-99.
- Komarova** Y.A., Huang F., Geyer M., Daneshjou N., Garcia A., Idalino L., Kreutz B., Mehta D., Malik A.B., **2012**. VE-cadherin signaling induces EB3 phosphorylation to suppress microtubule growth and assemble adherens junctions. *Mol. Cell.* 28;**48**(6):914-25.
- Komarova** Y.A., Vorobjev I.A., Borisy G.G., **2002b**. Life cycle of MTs: persistent growth in the cell interior, asymmetric transition frequencies and effects of the cell boundary. *J. Cell Sci.* 1;**115**(Pt 17):3527-39.
- Komulainen** E., Zdrojewska J., Freemantle E., Mohammad H., Kuleskaya N., Deshpande P., Marchisella F., Mysore R., Hollos P., Michelsen K.A., Mågard M., Rauvala H., James P., Coffey E.T., **2014**. JNK1 controls dendritic field size in L2/3 and L5 of the motor cortex, constrains soma size, and influences fine motor coordination. *Front Cell Neurosci.* 12;**8**:272.
- Kon** T., Imamula K., Roberts A.J., Ohkura R., Knight P.J., Gibbons I.R., Burgess S.A., Sutoh K., **2009**. Helix sliding in the stalk coiled coil of dynein couples ATPase and microtubule binding. *Nat. Struct. Mol. Biol.* **16**(3):325-33.
- Kononova** O., Kholodov Y., Theisen K.E., Marx K.A., Dima R.I., Ataulakhanov F.I., Grishchuk E.L., Barsegov V., **2015**. 52 Tubulin bond energies and microtubule biomechanics determined from nanoindentation in silico. *J. Biomol. Struct. Dyn.* **33** Suppl 1:35-36.
- Kosako** H., Yamaguchi N., Aranami C., Ushiyama M., Kose S., Imamoto N., Taniguchi H., Nishida E., Hattori S., **2009**. Phosphoproteomics reveals new ERK MAP kinase targets and links ERK to nucleoporin-mediated nuclear transport. *Nat. Struct. Mol. Biol.* **16**(10):1026-35.
- Koushika** S.P., **2008**. “JIP”ing along the axon: the complex roles of JIPs in axonal transport. *Bioessays.* **30**(1):10-4.
- Kreitzer** G., Liao G., Gundersen G.G., **1999**. Detyrosination of tubulin regulates the interaction of intermediate filaments with microtubules in vivo via a kinesin-dependent mechanism. *Mol. Biol. Cell.* **10**(4):1105-18.
- Kronebusch** P. and Singer S.J., **1987**. The microtubule-organizing complex and the Golgi apparatus are co-localized around the entire nuclear envelope of interphase cardiac myocytes. *J. Cell Sci.* **88** (Pt 1): 25-34.
- Kruse** R., Krantz J., Barker N., Coletta R.L., Rafikov R., Luo M., Højlund K., Mandarino L.J., Langlais P.R., **2017**. Characterization of the CLASP2 protein interaction network identifies SOGA1 as a Microtubule-Associated Protein. *Mol. Cell Proteomics.* **16**(10):1718-1735.

- Krylyskina O.**, Anderson K.I., Kaverina I., Upmann I., Manstein D.J., Small J.V., Toomre D.K., **2003**. Nanometer targeting of microtubules to focal adhesions. *J. Cell Biol.* 9;**161**(5):853-9.
- Kuan C.Y.**, Yang D.D., Samanta Roy D.R., Davis R.J., Rakic P., Flavell R.A., **1999**. The Jnk1 and Jnk2 protein kinases are required for regional specific apoptosis during early brain development. *Neuron.* **22**(4):667-76.
- Kukekov N.V.**, Xu Z., Greene L.A., **2006**. Direct interaction of the molecular scaffolds POSH and JIP is required for apoptotic activation of JNKs. *J. Biol. Chem.* 2;**281**(22):15517-24.
- Kumar A.**, Manatschal C., Rai A., Grigoriev I., Degen M.S., Jaussi R., Kretzschmar I., Prota A.E., Volkmer R., Kammerer R.A., Akhmanova A., Steinmetz M.O., **2017**. Short linear sequence motif LxxPTPh targets diverse proteins to growing microtubule ends. *Structure.* 6;**25**(6):924-932.
- Kumar A.**, Singh U.K., Kini S.G., Garg V., Agrawal S., Tomar P.K., Pathak P., Chaudhary A., Gupta P., Malik A., **2015**. JNK pathway signaling: a novel and smarter therapeutic targets for various biological diseases. *Future Med. Chem.* **7**(15):2065-86.
- Kumar P.**, and Wittmann T., **2012**. +TIPs: SxIPping along microtubule ends. *Trends Cell Biol.* **22**(8):418-28.
- Kumar P.**, Chimenti M.S., Pemble H., Schönichen A., Thompson O., Jacobson M.P., Wittmann T., **2012**. Multisite phosphorylation disrupts arginine-glutamate salt bridge networks required for binding of cytoplasmic linker-associated protein 2 (CLASP2) to end-binding protein 1 (EB1). *J. Biol. Chem.* 18;**287**(21):17050-64.
- Kumar P.**, Lyle K.S., Gierke S., Matov A., Danuser G., Wittmann T., **2009**. GSK3beta phosphorylation modulates CLASP-microtubule association and lamella microtubule attachment. *J. Cell Biol.* 23;**184**(6):895-908.
- Kuroda S.**, Fukata M., Kobayashi K., Nakafuku M., Nomura N., Iwamatsu A., Kaibuchi K., **1996**. Identification of IQGAP as a putative target for the small GTPases, Cdc42 and Rac1. *J. Biol. Chem.* 20;**271**(38):23363-7.
- Kwei S.L.**, Clement A., Faissner A., Brandt R., **1998**. Differential interactions of MAP2, tau and MAP5 during axogenesis in culture. *Neuroreport.* 20;**9**(6):1035-40.
- Kyriakis J.M.**, Avruch J., **1990**. pp54 microtubule-associated protein 2 kinase. A novel serine/threonine protein kinase regulated by phosphorylation and stimulated by poly-L-lysine. *J. Biol. Chem.* 5;**265**(28):17355-63.
- Kyriakis J.M.**, Banerjee P., Nikolakaki E., Dai T., Rubie E.A., Ahmad M.F., Avruch J., Woodgett J.R., **1994**. The stress-activated protein kinase subfamily of c-Jun kinases. *Nature.* 12;**369**(6476):156-60.

L

- Laan L.**, Pavin N., Husson J., Romet-Lemonne G., van Duijn M., López M.P., Vale R.D., Jülicher F., Reck-Peterson S.L., Dogterom M., **2012**. Cortical dynein controls microtubule dynamics to generate pulling forces that position microtubule asters. *Cell.* 3;**148**(3):502-14.
- Lafanechère L.** and Job D., **2000**. The third tubulin pool. *Neurochem Res.* **25**(1):11-8.
- Lahm H.W.** and Langen H., **2000**. Mass spectrometry: a tool for the identification of proteins separated by gels. *Electrophoresis.* **21**(11):2105-14.

- Lan W.**, Zhang X., Kline-Smith S.L., Rosasco S.E., Barrett-Wilt G.A., Shabanowitz J., Hunt D.F., Walczak C.E., Stukenberg P.T., **2004**. Aurora B phosphorylates centromeric MCAK and regulates its localization and microtubule depolymerization activity. *Curr. Biol.* 17;**14**(4):273-86.
- Lansbergen G.** and Akhmanova A., **2006**. Microtubule plus end: a hub of cellular activities. *Traffic.* 7(5):499-507.
- Lansbergen G.**, Grigoriev I., Mimori-Kiyosue Y., Ohtsuka T., Higa S., Kitajima I., Demmers J., Galjart N., Houtsmuller A.B., Grosveld F., Akhmanova A., **2006**. CLASPs attach microtubule plus ends to the cell cortex through a complex with LL5beta. *Dev. Cell.* 11(1):21-32.
- Lansbergen G.**, Komarova Y., Modesti M., Wyman C., Hoogenraad C.C., Goodson H.V., Lemaitre R.P., Drechsel D.N., van Munster E., Gadella T.W. Jr., Grosveld F., Galjart N., Borisy G.G., Akhmanova A., **2004**. Conformational changes in CLIP-170 regulate its binding to microtubules and dynactin localization. *J. Cell Biol.* 27;**166**(7):1003-14.
- Lantz V.A.** and Miller K.G., **1998**. A class VI unconventional myosin is associated with a homologue of a microtubule-binding protein, cytoplasmic linker protein-170, in neurons and at the posterior pole of *Drosophila* embryos. *J. Cell Biol.* 23;**140**(4):897-910.
- Larousserie D.**, **2016**. Voyage au cœur des cellules : Microtubules, la vie ne tient qu'à leurs fils. *Le Monde – Science & Médecine*.
- Larti F.**, Kahrizi K., Musante L., Hu H., Papari E., Fattahi Z., Bazazzadegan N., Liu Z., Banan M., Garshasbi M., Wienker T.F., Ropers H.H., Galjart N., Najmabadi H., **2015**. A defect in the CLIP1 gene (CLIP-170) can cause autosomal recessive intellectual disability. *Eur. J. Hum. Genet.* 23(3):331-6.
- Laurent C.E.**, Delfino F.J., Cheng H.Y., Smithgall T.E., **2004**. The human c-Fes tyrosine kinase binds tubulin and microtubules through separate domains and promotes microtubule assembly. *Mol. Cell Biol.* 24(21):9351-8.
- Law B.M.**, Spain V.A., Leinster V.H., Chia R., Beilina A., Cho H.J., Taymans J.M., Urban M.K., Sancho R.M., Blanca Ramírez M., Biskup S., Baekelandt V., Cai H., Cookson M.R., Berwick D.C., Harvey K., **2014**. A direct interaction between leucine-rich repeat kinase 2 and specific β -tubulin isoforms regulates tubulin acetylation. *J. Biol. Chem.* 10;**289**(2):895-908.
- Lazarus J.E.**, Moughamian A.J., Tokito M.K., Holzbaur E.L., **2013**. Dynactin subunit p150(Glued) is a neuron-specific anti-catastrophe factor. *PLoS Biol.* 11(7):e1001611.
- Leano J.B.**, Rogers S.L., Slep K.C., **2013**. A cryptic TOG domain with a distinct architecture underlies CLASP-dependent bipolar spindle formation. *Structure.* 4;**21**(6):939-50.
- LeDizet M.** and Piperno G., **1987**. Identification of an acetylation site of chlamydomonas alpha-tubulin. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* 84(16):5720-4.
- Lee H.S.**, Komarova Y.A., Nadezhdina E.S., Anjum R., Peloquin J.G., Schober J.M., Danciu O., van Haren J., Galjart N., Gygi S.P., Akhmanova A., Borisy G.G., **2010**. Phosphorylation controls autoinhibition of cytoplasmic linker protein-170. *Mol. Biol. Cell.* 1;**21**(15):2661-73.
- Lee J.C.**, Laydon J.T., McDonnell P.C., Gallagher T.F., Kumar S., Green D., McNulty D., Blumenthal M.J., Hays J.R., Landvatter S.W., Strickler J.E., McLaughlin M.M., Siemens I.R., Fisher S.M., Livi G.P., White J.R., Adams J.L., Young P.R., **1994**. A protein kinase involved in the regulation of inflammatory cytokine biosynthesis. *Nature.* 22-29;**372**(6508):739-6.
- Lee J.D.**, Ulevitch R.J., Han J., **1995**. Primary structure of BMK1: a new mammalian map kinase. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 15;**213**(2):715-24.

- Lee T., Langford K.J., Askham J.M., Brüning-Richardson A., Morrison E.E., 2008.** MCAK associates with EB1. *Oncogene*. 10;**27**(17):2494-500.
- Lefebvre C., Terret M.E., Djiane A., Rassinier P., Maro B., Verlhac M.H., 2002.** Meiotic spindle stability depends on MAPK-interacting and spindle-stabilizing protein (MISS), a new MAPK substrate. *J. Cell Biol.* 13;**157**(4):603-13.
- Le Grand M., Rovini A., Bourgarel-Rey V., Honore S., Bastonero S., Braguer D., Carre M., 2014.** ROS-mediated EB1 phosphorylation through Akt/GSK3 β pathway: implication in cancer cell response to microtubule-targeting agents. *Oncotarget*. 30;**5**(10):3408-23.
- Lei K. and Davis R.J., 2003.** JNK phosphorylation of Bim-related members of the Bcl2 family induces Bax-dependent apoptosis. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* 4;**100**(5):2432-7.
- Lei K., Nimmual A., Zong W.X., Kennedy N.J., Flavell R.A., Thompson C.B., Bar-Sagi D., Davis R.J., 2002.** The Bax subfamily of Bcl2-related proteins is essential for apoptotic signal transduction by c-Jun NH(2)-terminal kinase. *Mol. Cell Biol.* **22**(13):4929-42.
- Lemos C.L., Sampaio P., Maiato H., Costa M., Omel'yanchuk L.V., Liberal V., Sunkel C.E., 2000.** Mast, a conserved microtubule-associated protein required for bipolar mitotic spindle organization. *EMBO J.* 17;**19**(14):3668-82.
- Lenormand P., Sardet C., Pagès G., L'Allemain G., Brunet A., Pouyssegur J., 1993.** Growth factors induce nuclear translocation of MAP kinases (p42mapk and p44mapk) but not of their activator MAP kinase kinase (p45mapkk) in fibroblasts. *J. Cell Biol.* **122**(5):1079-88.
- Letort G., Nedelec F., Blanchoin L., Théry M., 2016.** Centrosome centering and decentering by microtubule network rearrangement. *Mol. Biol. Cell.* 15;**27**(18):2833-43.
- Leung C.L., Sun D., Zheng M., Knowles D.R., Liem R.K., 1999.** Microtubule actin cross-linking factor (MACF): a hybrid of dystonin and dystrophin that can interact with the actin and microtubule cytoskeletons. *J. Cell Biol.* 13;**147**(6):1275-86.
- Levesque A.A. and Compton D.A., 2001.** The chromokinesin Kid is necessary for chromosome arm orientation and oscillation, but not congression, on mitotic spindles. *J. Cell Biol.* 17;**154**(6):1135-46.
- Lewkowicz E., Herit F., Le Clainche C., Bourdoncle P., Perez F., Niedergang F., 2008.** The microtubule-binding protein CLIP-170 coordinates mDia1 and actin reorganization during CR3-mediated phagocytosis. *J. Cell Biol.* 29;**183**(7):1287-98.
- L'Hernault S.W. and Rosenbaum J.L., 1985.** Chlamydomonas alpha-tubulin is posttranslationally modified by acetylation on the epsilon-amino group of a lysine. *Biochemistry.* 15;**24**(2):473-8.
- Li D., Gao J., Yang Y., Sun L., Suo S., Luo Y., Shui W., Zhou J., Liu M., 2014.** CYLD coordinates with EB1 to regulate microtubule dynamics and cell migration. *Cell Cycle.* **13**(6):974-83.
- Li D., Sun X., Zhang L., Yan B., Xie S., Liu R., Liu M., Zhou J., 2014.** Histone deacetylase 6 and cytoplasmic linker protein 170 function together to regulate the motility of pancreatic cancer cells. *Protein. Cell.* **5**(3):214-23.
- Li H., Liu X.S., Yang X., Wang Y., Wang Y., Turner J.R., Liu X., 2010.** Phosphorylation of CLIP-170 by Plk1 and CK2 promotes timely formation of kinetochore-microtubule attachments. *EMBO J.* 1;**29**(17):2953-65.
- Li R. and Gundersen G.G., 2008.** Beyond polymer polarity: how the cytoskeleton builds a polarized cell. *Nat. Rev. Mol. Cell Biol.* **9**(11):860-73.

- Li S.**, Finley J., Liu Z.J., Qiu S.H., Chen H., Luan C.H., Carson M., Tsao J., Johnson D., Lin G., Zhao J., Thomas W., Nagy L.A., Sha B., DeLucas L.J., Wang B.C., Luo M., **2002**. Crystal structure of the cytoskeleton-associated protein glycine-rich (CAP-Gly) domain. *J. Biol. Chem.* 13;**277**(50):48596-601.
- Li W.**, Miki T., Watanabe T., Kakeno M., Sugiyama I., Kaibuchi K., Goshima G., **2011**. EB1 promotes microtubule dynamics by recruiting Sentin in drosophila cells. *J. Cell Biol.* 13;**193**(6):973-83.
- Li W.**, Moriwaki T., Tani T., Watanabe T., Kaibuchi K., Goshima G., **2012**. Reconstitution of dynamic microtubules with Drosophila XMAP215, EB1, and Sentin. *J. Cell Biol.* 26;**199**(5):849-62.
- Li X.H.** and Rhoades E., **2017**. Heterogeneous Tau-tubulin complexes accelerate microtubule polymerization. *Biophys.* 20;**112**(12):2567-2574.
- Ligon L.A.**, Shelly S.S., Tokito M.K., Holbaur E.L., **2006**. Microtubule binding proteins CLIP-170, EB1, and p150Glued form distinct plus-end complexes. *FEBS Lett.* 20;**580**(5):1327-32.
- Lim N.R.**, Yeap Y.Y., Zhao T.T., Yip Y.Y., Wong S.C., Xu D., Ang C.S., Williamson N.A., Xu Z., Bogoyevitch M.A., Ng D.C., **2015**. Opposing roles for JNK and Aurora A in regulating the association of WDR62 with spindle microtubules. *J. Cell Sci.* 1;**128**(3):527-40.
- Lin H.**, De Carvalho P., Kho D., Tai C.Y., Pierre P., Fink G.R., Pellman D., **2001**. Polyploids require Bik1 for kinetochore-microtubule attachment. *J. Cell Biol.* 24;**155**(7):1173-84.
- Lin S.X.**, Gundersen G.G., Maxfield F.R., **2002**. Export from pericentriolar endocytic recycling compartment to cell surface depends on stable, detyrosinated (glu) microtubules and kinesin. *Mol. Biol. Cell.* **13**(1):96-109.
- Lin T.C.**, Neuner A., Schiebel E., **2015**. Targeting of γ -tubulin complexes to microtubule organizing centers: conservation and divergence. *Trends Cell Biol.* **25**(5):296-307.
- Liou J.**, Kim M.L., Heo W.D., Jones J.T., Myers J.W., Ferrell J.E. Jr., Meyer T., **2005**. STIM is a Ca²⁺ sensor essential for Ca²⁺-store-depletion-triggered Ca²⁺ influx. *Curr. Biol.* 12;**15**(13):1235-41.
- Liu L.**, McKeehan W.L., Wang F., Xie R., **2012**. MAP1S enhances autophagy to suppress tumorigenesis. *Autophagy.* 1;**8**(2):278-80.
- Liu N.**, Xiong Y., Li S., Ren Y., He Q., Gao S., Zhou J., Shui W., **2015**. New HDAC6-mediated deacetylation sites of tubulin in the mouse brain identified by quantitative mass spectrometry. *Sci. Rep.* 19;**5**:16869.
- Liu N.**, Xiong Y., Ren Y., Zhang L., He X., Wang X., Liu M., Li D., Shui W., Zhou J., **2015**. Proteomic profiling and functional characterization of multiple post-translational modifications of tubulin. *J. Proteome Res.* 7;**14**(8):3292-304.
- Liu Q.**, Zuo J., Pierce E.A., **2004**. The retinitis pigmentosa 1 protein is a photoreceptor microtubule-associated protein. *J. Neurosci.* 21;**24**(29):6427-36.
- Lizcano J.M.**, Göransson O., Toth R., Deak M., Morrice N.A., Boudeau J., Hawley S.A., Udd L., Mäkelä T.P., Hardie D.G., Alessi D.R., **2004**. LKB1 is a master kinase that activates 13 kinases of the AMPK subfamily, including MARK/PAR-1. *EMBO J.* 25;**23**(4):833-43.
- Lomakin A.J.**, Kraikivski P., Semenova I., Ikeda K., Zaliapin I., Tirnauer J.S., Akhmanova A., Rodionov V., **2011**. Stimulation of the CLIP-170-dependent capture of membrane organelles by microtubules through fine tuning of microtubule assembly dynamics. *Mol. Biol. Cell.* **22**(21):4029-37.

Lomakin A.J., Semenova I., Zaliapin I., Kraikivski P., Nadezhdina E., Slepchenko B.M., Akhmanova A., Rodionov V., 2009. CLIP-170-dependent capture of membrane organelles by microtubules initiates minus-end directed transport. *Dev. Cell.* **17**(3):323-33.

Lopus M., Manatschal C., Buey R.M., Bjelić S., Miller H.P., Steinmetz M.O., Wilson L., 2012. Cooperative stabilization of microtubule dynamics by EB1 and CLIP-170 involves displacement of stably bound P(i) at microtubule ends. *Biochemistry.* **51**(14):3021-30.

Louie R.K., Bahmanyar S., Siemers K.A., Votin V., Chang P., Stearns T., Nelson W.J., Barth A.I., 2004. Adenomatous polyposis coli and EB1 localize in close proximity of the mother centriole and EB1 is a functional component of centrosomes. *J. Cell Sci.* **117**(Pt 7):1117-28.

Lovrić J., Dammeier S., Kieser A., Mischak H., Kolch W., 1998. Activated raf induces the hyperphosphorylation of stathmin and the reorganization of the microtubule networks. *J. Biol. Chem.* **273**(35):22848-55.

Lüders J., Stearns T., 2007. Microtubule-organizing centres: a re-evaluation. *Nat. Rev. Mol. Cell Biol.* **8**(2):161-7.

Ludueña R.F., 2013. A hypothesis on the origin and evolution of tubulin. *Int. Rev. Cell Mol. Biol.* **302**:41-185.

Lumb J.H., Connell J.W., Allison R., Reid E., 2012. The AAA ATPase spastin links microtubule severing to membrane modelling. *Biochim. Biophys. Acta.* **1823**(1):192-7.

Luo Y., Ran J., Xie S., Yang Y., Chen J., Li S., Shui W., Li D., Liu M., Zhou J., 2016. ASK1 controls spindle orientation and positioning by phosphorylating EB1 and stabilizing astral microtubules. *Cell Discov.* **4**:2:16033.

M

Ma X. and Sayeski P.P., 2007. Identification of tubulin as a substrate of Jak2 tyrosine kinase and its role in Jak2-dependent signaling. *Biochemistry.* **46**(24):7153-62.

Machado-Neto J.A., Saad S.T., Traina F., 2014. Stathmin 1 in normal and malignant hematopoiesis. *BMB Rep.* **47**(12):660-5.

Mack G.J. and Compton D.A., 2001. Analysis of mitotic microtubule-associated proteins using mass spectrometry identifies astrin, a spindle-associated protein. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* **98**(25):14434-9.

Mackeh R., Lorin S., Ratier A., Mejdoubi-Charef N., Baillet A., Bruneel A., Hamaï A., Codogno P., Poüs C., Perdiz D., 2014. Reactive oxygen species, AMP-activated protein kinase, and the transcription cofactor p300 regulate α -tubulin acetyltransferase-1 (α TAT-1/MEC-17)-dependent microtubule hyperacetylation during cell stress. *J. Biol. Chem.* **289**(17):11816-28.

Mackeh R., Perdiz D., Lorin S., Codogno P., Poüs C., 2013. Autophagy and microtubules – new story, old players. *J. Cell Sci.* **126**(Pt 5):1071-80.

MacRae T.H., 1997. Tubulin post-translational modifications — enzymes and their mechanisms of action. *Eur. J. Biochem.* **244**(2):265-78.

Maday S., Twelvetrees A.E., Moughamian A.J., Holzbaur E.L., 2014. Axonal transport: cargo-specific mechanisms of motility and regulation. *Neuron.* **84**(2):292-309.

Maeda T., Takekawa M., Saito H., 1995. Activation of yeast PBS2 MAPKK by MAPKKKs or by binding of an SH3-containing osmosensor. *Science.* **269**(5223):551-8.

- Maffini S.**, Maia A.R., Manning A.L., Maliga Z., Pereira A.L., Junqueira M., Shevchenko A., Hyman A., Yates J.R. 3rd., Galjart N., Compton D.A., Maiato H., **2009**. Moto-independent targeting of CLASPs to kinetochores by CENP-E promotes microtubule turnover and poleward flux. *Curr. Biol.* 29;**19**(18):1566-72.
- Maia A.R.**, Garcia Z., Kabeche L., Barisic M., Maffini S., Macedi-Ribeiro S., Cheeseman I.M., Compton D.A., Kaverina I., Maiato H., **2012**. Cdk1 and Plk1 mediate a CLASP2 phospho-switch that stabilizes kinetochore-microtubule attachments. *J. Cell Biol.* 15;**199**(2):285-301.
- Mallik R.** and Gross S.P., **2004**. Molecular motors: strategies to get along. *Curr. Biol.* 23;**14**(22):R971-82.
- Manatschal C.**, Farcas A.M., Degen M.S., Bayer M., Kumar A., Landgraf C., Volkmer R., Barral Y., Steinmetz M.O., **2016**. Molecular basis of Kar9-Bim1 complex function during mating and spindle positioning. *Mol. Biol. Cell.* **27**(23):3729-3745.
- Manieri E.** and Sabio G., **2015**. Stress kinases in the modulation of metabolism and energy balance. *J. Mol. Endocrinol.* **55**(2):R11-22.
- Manna T.**, Thrower D., Miller H.P., Curmi P., Wilson L., **2006**. Stathmin strongly increases the minus end catastrophe frequency and induces rapid treadmilling of bovine brain microtubules at steady state in vitro. *J. Biol. Chem.* 27;**281**(4):2071-8.
- Manning A.L.**, Bakhoun S.F., Maffini S., Correia-Melo C., Maiato H., Compton D.A., **2010**. CLASP1, astrin and Kif2b form a molecular switch that regulates kinetochore-microtubule dynamics to promote mitotic progression and fidelity. *EMBO J.* 20;**29**(20):3531-43.
- Manning A.L.**, Ganem N.J., Bakhoun S.F., Wagenbach M., Wordeman L., Compton D.A., **2007**. The kinesin-13 proteins Kif2a, Kif2b, and Kif2c/MCAK have distinct roles during mitosis in human cells. *Mol. Biol. Cell.* **18**(8):2970-9.
- Manning G.**, Whyte D.B., Martinez R., Hunter T., Sudarsanam S., **2002**. The protein kinase complement of the human genome. *Science.* 6;**298**(5600):1912-34.
- Marchisella F.**, Coffey E.T., Hollos P., **2016**. Microtubule and microtubule associated protein anomalies in psychiatric disease. *Cytoskeleton (Hoboken).* **73**(10):596-611.
- Margolis R.L.** and Wilson L., **1978**. Opposite end assembly and disassembly of microtubules at steady state in vitro. *Cell.* **13**(1):1-8.
- Marklund U.**, Brattsand G., Shingler V., Gullberg M., **1993**. Serine 25 of oncoprotein 18 is a major cytosolic target for the mitogen-activated protein kinase. *J. Biol. Chem.* 15;**268**(20):15039-47.
- Martín-García R.** and Mulvihill D.P., **2009**. Myosin V spatially regulates microtubule dynamics and promotes the ubiquitin-dependent degradation of the fission yeast CLIP-170 homologue, Tip1. *J. Cell Sci.* 1;**122**(Pt 21):3862-72.
- Máthé E.**, Inoue Y.H., Palframan W., Brown G., Glover D.M., **2003**. Orbit/Mast, the CLASP orthologue of *Drosophila*, is required for asymmetric stem cell and cystocyte divisions and development of the polarised microtubule network that interconnects oocyte and nurse cells during oogenesis. *Development.* **130**(5):901-15.
- Matten W.T.**, Aubry M., West J., Maness P.F., **1990**. Tubulin is phosphorylated at tyrosine by pp60c-src in nerve growth cone membranes. *J. Cell Biol.* **111**(5 Pt 1):1959-70.
- Maurer S.P.**, Bieling P., Cope J., Hoenger A., Surrey T., **2011**. GTPgammaS microtubules mimic the growing microtubule end structure recognized by end-binding proteins (EBs). *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* 8;**108**(10):3988-93.

- Maurer S.P.**, Cade N.I., Bohner G., Gustafsson N., Boutant E., Surrey T., **2014**. EB1 accelerates two conformational transitions important for microtubule maturation and dynamics. *Curr. Biol.* 17;**24**(4):372-84.
- Mayr M.I.**, Hümmer S., Bormann J., Grüner T., Adio S., Woehlke G., Mayer T.U., **2007**. The human kinesin Kif18A is a motile microtubule depolymerase essential for chromosome congression. *Curr. Biol.* 20;**17**(6):488-98.
- McKean P.G.**, Vaughan S., Gull K., **2001**. The extended tubulin superfamily. *J. Cell Sci.* **114**(Pt 15):2723-33.
- Megiorni F.**, Mora B., Indovina P., Mazzilli M.C., **2005**. Expression of neuronal markers during NTera2/cloneD1 differentiation by cell aggregation method. *Neurosci. Lett.* 10;**373**(2):105-9.
- Mejillano M.R.** and Himes R.H., **1991**. Assembly properties of tubulin after carboxyl group modification. *J. Biol. Chem.* 5;**266**(1):657-64.
- Mejillano M.R.**, Tolo E.T., Williams R.C. Jr., Himes R.H., **1992**. The conversion of tubulin carboxyl groups to amides has a stabilizing effect on microtubules. *Biochemistry.* 7;**31**(13):3478-83.
- Melki R.**, Carlier M.F., Pantaloni D., Timasheff S.N., **1989**. Cold depolymerization of microtubules to double rings: geometric stabilization of assemblies. *Biochemistry.* 14;**28**(23):9143-52.
- Meng W.**, Mushika Y., Ichii T., Takeichi M., **2008**. Anchorage of microtubule minus ends to adherens junctions regulates epithelial cell-cell contacts. *Cell.* 28;**135**(5):948-59.
- Michot J.M.**, Lazarovici J., Ghez D., Danu A., Fermé C., Bigorgne A., Ribrag V., Marabelle A., Aspeslagh S., **2017**. Challenges and perspectives in the immunotherapy of Hodgkin lymphoma. *Eur J. Cancer.* 8;**85**:67-77.
- Miki H.**, Setou M., Kaneshiro K., Hirokawa N., **2001**. All kinesin superfamily protein, KIF, genes in mouse and human. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* 19;**98**(13):7004-11.
- Miki H.**, Okada Y., Hirokawa N., **2005**. Analysis of the kinesin super family: insights into structure and function. *Trends Cell Biol.* **15**(9):467-76.
- Mimori-Kiyosue Y.**, Grigoriev I., Lansbergen G., Sasaki H., Matsui C., Severin F., Galjart N., Grosveld F., Vorobjev I., Tsukita S., Akhmanova A., **2005**. CLASP1 and CLASP2 bind to EB1 and regulate microtubule plus-end dynamics at the cell cortex. *J. Cell Biol.* 3;**168**(1):141-53.
- Mimori-Kiyosue Y.**, Shiina N., Tsukita S., **2000**. Adenomatous polyposis coli (APC) protein moves along microtubules and concentrates at their growing ends in epithelial cells. *J. Cell Biol.* 7;**148**(3):505-18.
- Minin A.A.**, **1997**. Dispersal of Golgi apparatus in nocodazole-treated fibroblasts is a kinesin-driven process. *J. Cell Sci.* **110**(Pt 19):2495-505.
- Mishima M.**, Maesaki R., Kasa M., Watanabe T., Fukata M., Kaibuchi K., Hakoshima T., **2007**. Structural basis for tubulin recognition by cytoplasmic linker protein 170 and its autoinhibition. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* 19;**104**(25):10346-51.
- Mitchison T.J.**, **1993**. Localization of an exchangeable GTP binding site at the plus end of microtubules. *Science.* 20;**261**(5124):1044-7.
- Mitchison T.** and Kirschner M., **1984a**. Microtubule assembly nucleated by isolated centrosomes. *Nature.* 15-21;**312**(5991):232-7.

- Mitchison T.** and Kirschner M., **1984b**. Dynamic instability of microtubule growth. *Nature*. 15-21;**312**(5991):237-42.
- Mitsopoulos C.**, Zihni C., Garg R., Ridley A.J., Morris J.D., **2003**. The prostate-derived sterile 20-like kinase (PSK) regulates microtubule organization and stability. *J. Biol. Chem.* 16;**278**(20):18085-91.
- Mohan R.** and John A., **2015**. Microtubule-associated proteins as direct crosslinkers of actin filaments and microtubules. *IUBMB Life*. **67**(6):395-403.
- Molk J.N.**, Salmon E.D., Bloom K., **2006**. Nuclear congression is driven by cytoplasmic microtubule plus end interactions in *S. cerevisiae*. *J. Cell Biol.* 2;**172**(1):27-39.
- Montenegro Gouveia S.**, Leslie K., Kapitein L.C., Buey R.M., Grigoriev I., Wagenbach M., Smal I., Maijering E., Hoogenraad C.C., Wordeman L., Steinmetz M.O., Akhmanova A., **2010**. In vitro reconstitution of the functional interplay between MCAK and EB3 at microtubule plus ends. *Curr. Biol.* 12;**20**(19):1717-22.
- Moore A.T.**, Rankin K.E., von Dassow G., Peris L., Wagenbach M., Ovechkina Y., Andrieux A., Job D., Wordeman L., **2005**. MCAK associates with the tips of polymerizing microtubules. *J. Cell Biol.* 9;**169**(3):391-7.
- Moore C.A.**, Yu M., Guo J., Beraud C., Sakowicz R., Milligan R.A., **2002**. A mechanism for microtubule depolymerization by KinI kinesins. *Mol. Cell.* 9(4):903-9.
- Morfini G.**, Pigino G., Szebenyi G., You Y., Pollema S., Brady S.T., **2006**. JNK mediates pathogenic effects of polyglutamine-expanded androgen receptor on fast axonal transport. *Nat. Neurosci.* 9(7):907-16.
- Morfini G.**, Szebenyi G., Elluru R., Ratner N., Brady S.T., **2002**. Glycogen synthase kinase 3 phosphorylates kinesin light chains and negatively regulates kinesin-based motility. *EMBO J.* 1;**21**(3):281-93.
- Morfini G.A.**, You Y.M., Pollema S.L., Kaminska A., Liu K., Yoshioka K., Björkblom B., Coffey E.T., Bagnato C., Han D., Huang C.F., Banker G., Pigino G., Brady S.T., **2009**. Pathogenic huntingtin inhibits fast axonal transport by activating JNK3 and phosphorylating kinesin. *Nat. Neurosci.* 12(7):864-71.
- Moriwaki T.** and Goshima G., **2016**. Five factors can reconstitute all three phases of microtubule polymerization dynamics. *J. Cell Biol.* 7;**215**(3):357-368.
- Moseley J.B.**, Bartolini F., Okada K., Wen Y., Gunderson G.G., Goode B.L., **2007**. Regulated binding of adenomatous polyposis coli protein to actin. *J. Biol. Chem.* 27;**282**(17):12661-8.
- Mostowy S.** and Cossart P., **2012**. Septins: the fourth component of the cytoskeleton. *Nature Review Mol. Cell. Biol.* 8;**13**(3):183-94.
- Moudi M.**, Go R., Yien C.Y., Nazre M., **2013**. Vinca alkaloids. *Int. J. Prev. Med.* 4(11):1231-5.
- Moughamian A.J.**, Osborn G.E., Lazarus J.E., Maday S., Holzbaur E.L., **2013**. Ordered recruitment of dynactin to the microtubule plus-end is required for efficient initiation of retrograde axonal transport. *J. Neurosci.* 7;**33**(32):13190-203.
- Mukai M.**, Ikegami K., Sugiura Y., Takeshita K., Nakagawa A., Setou M., **2009**. Recombinant mammalian tubulin polyglutamylase TLL7 performs both initiation and elongation of polyglutamylation on beta-tubulin through a random sequential pathway. *Biochemistry.* 10;**48**(5):1084-93.

Mukherjee S., Diaz Valencia J.D., Stewman S., Metz J., Monnier S., Rath U., Asenjo A.B., Charafeddine R.A., Sosa H.J., Ross J.L., Ma A., Sharp D.J., **2012**. Human Fidgetin is a microtubule severing the enzyme and minus-end depolymerase that regulates mitosis. *Cell Cycle*. 15;**11**(12):2359-66.

Munemitsu S., Souza B., Müller O., Albert I., Rubinfeld B., Polakis P., **1994**. The APC gene product associates with microtubules in vivo and promotes their assembly in vitro. *Cancer Res*. 15;**54**(14):3676-81.

Mustyatsa V.V., Boyakhchyan A.V., Ataulakhanov F.I., Gudimchuk N.B., **2017**. EB-Family proteins: functions and microtubule interaction mechanisms. *Biochemistry (Mosc)*. **82**(7):791-802.

Muthaiah V.P.K., Michael F.M., Palaniappan T., Rajan S.S., Chandrasekar K., Venkatachalam S., **2017**. JNK1 and JNK3 play a significant role in both neuronal apoptosis and necrosis. Evaluation based on in vitro approach using ter-butylhydroperoxide induced oxidative stress in neuro-2A cells and perturbation through 3-aminobenzamide. *Toxicol. In Vitro*. **41**:168-178.

Muto E., Sakai H., Kaseda K., **2005**. Long-range cooperative binding of kinesin to a microtubule in the presence of ATP. *J. Cell Biol*. 28;**168**(5):691-6.

Myer N.M and Myers K.A., **2017**. CLASP1 regulates endothelial cell branching morphology and directed migration. *Biol. Open*. 16;**6**(10):1502-1515.

N

Naghavi M.H. and Walsh D., **2017**. Microtubule regulation and function during virus infection. *J. Virol*. 27;**91**(16):e00538-17.

Nakagawa H., Koyama K., Murata Y., Morito M., Akiyama T., Nakamura Y., **2000**. EB3, a novel member of the EB1 family preferentially expressed in the central nervous system, binds to a CNS-specific APC homologue. *Oncogene*. 13;**19**(2):210-6.

Nakagawa H., Murata Y., Koyama K., Fujiyama A., Miyoshi Y., Monden M., Akiyama T., Nakamura Y., **1998**. Identification of a brain-specific APC homologue, APCL, and its interaction with beta-catenin. *Cancer Res*. 15;**58**(22):5176-81.

Nakamura M., Zhou X.Z., Lu K.P., **2001**. Critical role for the EB1 and APC interaction in the regulation of microtubule polymerization. *Curr. Biol*. 10;**11**(13):1062-7.

Nakano A., Kato H., Watanabe T., Min K.D., Yamazaki S., Asano Y., Seguchi O., Higo S., Shintani Y., Asanuma H., Asakura M., Minamino T., Kaibuchi K., Mochizuki N., Kitakaze M., Takashima S., **2010**. AMPK controls the speed of microtubule polymerization and directional cell migration through CLIP-170 phosphorylation. *Nat. Cell Biol*. **12**(6):583-90.

Nakano A. and Takashima S., **2012**. LKB1 and AMP-activated protein kinase: regulators of cell polarity. *Genes Cells*. **17**(9):737-47.

Nangaku M., Sato-Yoshitake R., Okada Y., Noda Y., Takemura R., Yamazaki H., Hirokawa N., **1994**. KIF1B, a novel microtubule plus end-directed monomeric motor protein for transport of mitochondria. *Cell*. 30;**79**(7):1209-20.

Nehlig A., Molina A., Rodrigues-Ferreira S., Honoré S., Nahmias C., **2017**. Regulation of end-binding protein EB1 in the control of microtubule dynamics. *Cell Mol. Life Sci*. **74**(13):2381-2393.

Neukirchen D. and Bradke F., **2011**. Cytoplasmic linker proteins regulate neuronal polarization through microtubule and growth cone dynamics. *J. Neurosci*. 26;**31**(4):1528-38.

- Neuwald** A.F. and Hirano T., **2000**. HEAT repeats associated with condensins, cohesins, and other complexes involved in chromosome-related functions. *Genome Res.* **10**(10):1445-52.
- Newton** C.N., Wagenbach M., Ovechkina Y., Wordeman L., Wilson L., **2004**. MCAK, a Kin I kinesin, increases the catastrophe frequency of steady-state HeLa cell microtubules in an ATP-dependent manner in vitro. *FEBS Lett.* **13**;572(1-3):80-4.
- Nguyen** T., Ruan Z., Oruganty K., Kannan N., **2015**. Co-conserved MAPK features couple D-domain docking groove to distal allosteric sites via the C-terminal flanking tail. *PLoS One.* **23**;10(3):e0119636.
- Niethammer** P., Kronja I., Kandels-Lewis S., Rybina S., Bastiaens P., Karsenti E., **2007**. Discrete states of a protein interaction network govern interphase and mitotic microtubule dynamics. *PLoS Biol.* **5**(2):e29.
- Nihalani** D., Wong H.N., Holzman L.B., **2003**. Recruitment of JNK to JIP1 and JNK-dependent JIP1 phosphorylation regulates JNK module dynamics and activation. *J. Biol Chem.* **1**;278(31):28694-702.
- Nirschl** J.J., Magiera M.M., Lazarus J.E., Janke C., Holzbaur E.L., **2016**. α -tubulin tyrosination and CLIP-170 phosphorylation regulate the initiation of dynein-driven transport in neurons. *Cell Rep.* **22**;14(11):2637-52.
- Nitta** R.T., Badal S.S., Wong A.J., **2010**. Measuring the constitutive activation of c-Jun N-terminal kinase isoforms. *Methods Enzymol.* **484**:531-48.
- Nitta** R.T., Chu A.H., Wong A.J., **2008**. Constitutive activity of JNK2 α 2 is dependent on a unique mechanism of MAPK activation. *J. Biol. Chem.* **12**;283(50):34935-45.
- Nitta** R.T., Del Vecchio C.A., Chu A.H., Mitra S.S., Godwin A.K., Wong A.J., **2011**. The role of the c-Jun N-terminal kinase 2- α -isoform in non-small cell lung carcinoma tumorigenesis. *Oncogene.* **13**;30(2):234-44.
- Noble** R.L., Beer C.T., Cutts J.H., **1958**. Role of chance observations in chemotherapy: *Vinca rosea*. *Ann. N.Y. Acad. Sci.* **5**;76(3):882-94.
- Noda** Y., Sato-Yoshitake R., Kondo S., Nangaku M., Hirokawa N., **1995**. KIF2 is a new microtubule-based anterograde motor that transports membranous organelles distinct from those carried by kinesin heavy chain or KIF3A/B. *J. Cell Biol.* **129**(1):157-67.
- Nogales** E., **2000**. Structural insights into microtubule function. *Annu. Rev. Biochem.* **69**:277-302.
- Nogales** E. and Zhang R., **2016**. Visualizing microtubule structural transitions and interactions with associated proteins. *Curr. Opin. Struct. Biol.* **37**:90-6.
- Nogales** E., Whittaker M., Milligan R.A., Downing K.H., **1999**. High-resolution model of the microtubule. *Cell.* **8**;96(1):79-88.
- Nogales** E., Wolf S.G., Downing K.H., **1998**. Structure of the alpha beta tubulin dimer by electron crystallography. *Nature.* **8**;391(6663):199-203.
- Noordstra** I. and Akhmanova A., **2017**. Linking cortical microtubule attachment and exocytosis. *F1000Res.* **12**;6:469.

O

Oakley B.R., 2000. An abundance of tubulins. *Trends Cell Biol.* **10**(12):537-42.

Oakley C.E. and Oakley B.R., 1989. Identification of gamma-tubulin, a new member of the tubulin superfamily encoded by mipA gene of *Aspergillus nidulans*. *Nature.* **20**;338(6217):662-4.

Ohkura H., Garcia M.A., Toda T., 2001. Dis1/TOG universal microtubule adaptors – one MAP for all? *J. Cell Sci.* **114**(Pt 21):3805-12.

Oiwa K. and Sakakibara H., 2005. Recent progress in dynein structure and mechanism. *Curr. Opin. Cell Biol.* **17**(1):98-103.

Ori-McKenney K.M., McKenney R.J., Huang H.H., Li T., Meltzer S., Jan L.Y., Vale R.D., Wiita A.P., Jan Y.N., 2016. Phosphorylation of β -tubulin by the down syndrome kinase, minibrain/DYRK1a, regulates microtubules dynamics and dendrite morphogenesis. *Neuron.* **4**;90(3):551-63.

Oropesa Ávila M., Fernández Vega A., Garrido Maraver J., Villanueva Paz M., De Laveria I., De La Mata M., Cordero M.D., Alcocer Gómez E., Delgado Pavón A., Álvarez Córdoba M., Cotán D., Sánchez-Alcázar J.A., 2015. Emerging roles of apoptotic microtubules during the excusion phase of apoptosis. *Cytoskeleton (Hoboken).* **72**(9):435-46.

Ozer R.S. and Halpain S., 2000. Phosphorylation-dependent localization of microtubule-associated protein MAP2c to the actin cytoskeleton. *Mol. Biol. Cell.* **11**(10):3573-87.

Ozols J. and Caron J.M., 1997. Posttranslational modification of tubulin by palmitoylation: II. Identification of sites of palmitoylation. *Mol. Biol. Cell.* **8**(4):637-45.

P

Pal M., Febbraio M.A., Lancaster G.I., 2016. The roles of c-Jun NH2-terminal kinases (JNKs) in obesity and insulin resistance. *J. Physiol.* **15**;594(2):267-79.

Palazzo A., Ackerman B., Gundersen G.G., 2003. Cell biology: Tubulin acetylation and cell motility. *Nature.* **16**;421(6920):230.

Paluh J.L., Nogales E., Oakley B.R., McDonald K., Pidoux A.L., Cande W.Z., 2000. A mutation in gamma-tubulin alters microtubule dynamics and organization and is synthetically lethal with the kinesin-like protein pkl1p. *Mol. Biol. Cell.* **11**(4):1225-39.

Pan C., Olsen J.V., Daub H., Mann M., 2009. Global effects of kinase inhibitors on signaling networks revealed by quantitative phosphoproteomics. *Mol. Cell Proteomics.* **8**(12):2796-808.

Panda D., Miller H.P., Banerjee A., Ludueña R.F., Wilson L., 1994. Microtubule dynamics in vitro are regulated by the tubulin isotype composition. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* **22**;91(24):11358-62.

Park E.C., Lee H., Hong Y., Kim M.J., Lee Z.W., Kim S.I., Kim S., Kim G.H., Han J.K., 2012. Analysis of the expression of microtubule plus-end tracking proteins (+TIPs) during *Xenopus laevis* embryogenesis. *Gene Expr. Patterns.* **12**(5-6):204-12.

Papoulas O., Hays T.S., Sisson J.C., 2005. The golgin Lava lamp mediates dynein-based Golgi movements during *Drosophila* cellularization. *Nat. Cell Biol.* **7**(6):612-8.

Park I.Y., Powell R.T., Tripathi D.N., Dere R., Ho T.H., Blasius T.L., Chiang Y.C., Davis I.J., Fahey C.C., Hacker K.E., Verhey K.J., Bedford M.T., Jonasch E., Rathmell W.K., Walker C.L., 2016. Dual chromatin and cytoskeletal remodeling by SETD2. *Cell.* **11**;166(4):950-62.

- Parker A.L., Kavallaris M., McCarroll J.A., 2014.** Microtubules and their role in cellular stress in cancer. *Front. Oncol.* 18;4:153.
- Parker A.L., Teo W.S., McCarroll J.A., Kavallaris M., 2017.** An emerging role for tubulin isotypes in modulating cancer biology and chemotherapy resistance. *Int. J. Mol. Sci.* 4;18(7).
- Parker C.G., Hunt- J., Diener K., McGinley M., Soriano B., Keesler G.A., Bray J., Yao Z., Wang X.S., Kohno T., Lichenstein H.S., 1998.** Identification of stathmin as a novel substrate for p38 delta. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 28;249(3):791-6.
- Patel K., Nogales E., Heald R., 2012.** Multiple domains of human CLASP contribute to microtubule dynamics and organization in vitro and in Xenopus egg extracts. *Cytoskeleton (Hoboken).* 69(3):155-65.
- Paturle-Lafanechère L., Manier M., Trigault N., Pirolet F., Mazarguil H., Job D., 1994.** Accumulation of delta 2-tubulin, a major tubulin variant that cannot be tyrosinated, in neuronal tissues and in stable microtubule assemblies. *J. Cell Sci.* 107(Pt 6):1529-43.
- Peng X., Angelastro J.M., Greene L.A. 1996.** Tyrosine phosphorylation of extracellular signal-regulated protein kinase 4 in response to growth factors. *J. Neurochem.* 66(3):1191-7.
- Penna L.S., Henriques J.A.P., Bonatto D., 2017.** Anti-mitotic agents: Are they emerging molecules for cancer treatment? *Pharmacol. Ther.* 173:67-82.
- Perdiz D., Lorin S., Leroy-Gori I., Poüs C., 2017.** Stress-induced hyperacetylation of microtubule enhances mitochondrial fission and modulates the phosphorylation of Drp1 at 616Ser. *Cell Signal.* 28;39:32-43.
- Pereira A.J. and Maiato H., 2010.** Improved kymography tools and its applications to mitosis. *Methods.* 51(2):214-9.
- Perez F., Diamantopoulos G.S., Stalder R., Kreis T.E., 1999.** CLIP-170 highlights growing microtubule ends in vivo. *Cell.* 19;96(4):517-27.
- Perez F., Pernet-Gallay K., Nizak C., Goodson H.V., Kreis T.E., Goud B., 2002.** CLIPR-59, a new trans-Golgi/TGN cytoplasmic linker protein belonging to the CLIP-170 family. *J. Cell Biol.* 18;156(4):631-42.
- Peris L., Thery M., Fauré J., Saoudi Y., Lafanechère L., Chilton J.K., Gordon-Weeks P., Galjart N., Bornens M., Wordeman L., Wehland J., Andrieux A., Job D., 2006.** Tubulin tyrosination is a major factor affecting the recruitment of CAP-Gly proteins at microtubule plus ends. *J. Cell Biol.* 11;174(6):839-49.
- Peris L., Wagenbach M., Lafanechère L., Brocard J., Moore A.T., Kozielski F., Job D., Wordeman L., Andrieux A., 2009.** Motor-dependent microtubule disassembly driven by tubulin tyrosination. *J. Cell Biol.* 29;185(7):1159-66.
- Peset I. and Vernos I., 2008.** The TACC proteins: TACC-ling microtubule dynamics and centrosome function. *Trends Cell Biol.* 18(8):379-88.
- Peters J.D., Furlong M.T., Asai D.J., Harrison M.L., Geahlen R.L., 1996.** Syk, activated by cross-linking the B-cell antigen receptor, localizes to the cytosol where it interacts with and phosphorylates alpha-tubulin on tyrosine. *J. Biol. Chem.* 1;271(9):4755-62.
- Petry S. and Vale R.D., 2015.** Microtubule nucleation at the centrosome and beyond. *Nat. Cell Biol.* 17(9):1089-93.

Phung-Koskas T., Pilon A., Poüs C., Betzina C., Sturm M., Bourguet-Kondracki M.L., Durand G., Drechou A., **2005**. STAT5B-mediated growth hormone signaling is organized by highly dynamic microtubules in hepatic cells. *J. Biol. Chem.* **280**:1123-1131.

Picco V. and Pagès G., **2013**. Linking JNK activity to the DNA damage response. *Genes Cancer.* **4**(9-10):360-8.

Pierre P., Pepperkok R., Kreis T.E., **1994**. Molecular characterization of two functional domains of CLIP-170 in vivo. *J. Cell Sci.* **107**(Pt 7):1909-20.

Pierre P., Scheel J., Rickard J.E., Kreis T.E., **1992**. CLIP-170 links endocytic vesicles to microtubules. *Cell.* **18**;70(6):887-900.

Pilon A. and Poüs C., **2013**. [Compartmentalization and plasticity of the microtubule network]. *Med. Sci. (Paris).* **29**(2):194-9 [Article in French]

Pimienta G., Ficarro S.B., Gutierrez G.J., Bhoumik A., Peters E.C., Ronai Z., Pascual J., **2007**. Autophosphorylation properties of inactive and active JNK2. *Cell Cycle.* **15**;6(14):1762-71.

Ploia C., Antoniou X., Sclip A., Grande V., Cardinetti D., Colombo A., Canu N., Benussi L., Ghidoni R., Forloni G., Borsello T., **2011**. JNK plays a key role in tau hyperphosphorylation in Alzheimer's disease models. *J. Alzheimers Dis.* **26**(2):315-29.

Popov A.V., Pozniakovsky A., Arnal I., Antony C., Ashford A.J., Kinoshita K., Tournebize R., Hyman A.A., Karsenti E., **2001**. XMAP215 regulates microtubule dynamics through two distinct domains. *EMBO J.* **1**;20(3):397-410.

Pouyssegur J. and Lenormand P., **2003**. Fidelity and spatio-temporal control in MAP kinase (ERKs) signaling. *Eur. J. Biochem.* **270**(16):3291-9.

Prota A.E., Bargsten K., Zurwerra D., Field J.J., Diaz J.F., Altmann K.H., Steinmetz M.O., **2013a**. Molecular mechanism of action of microtubule-stabilizing anticancer agents. *Science.* **1**;339(6119):587-90.

Prota A.E., Magiera M.M., Kuijpers M., Bargsten K., Frey D., Wieser M., Jaussi R., Hoogenraad C.C., Kammerer R.A., Janke C., Steinmetz M.O., **2013b**. Structural basis of tubulin tyrosination by tubulin tyrosine ligase. *J. Cell Biol.* **4**;200(3):259-70.

Putney J.W. Jr., **2007**. New molecular players in capacitative Ca²⁺ entry. *J. Cell Sci.* **15**;120(Pt 12):1959-65.

R

Raingeaud J., Gupta S., Rogers J.S., Dickens M., Han J., Ulevitch R.J., Davis R.J., **1995**. Pro-inflammatory cytokines and environmental stress cause p38 mitogen-activated protein kinase activation by dual phosphorylation on tyrosine and threonine. *J. Biol. Chem.* **31**;270(13):7420-6.

Raman M., Chen W., Cobb M.H., **2007**. Differential regulation and properties of MAPKs. *Oncogene.* **14**;26(22):3100-12.

Ramkumar A., Jong B.Y., Ori-McKenney K.M., **2017**. ReMAPping the microtubule landscape: how phosphorylation dictates the activities of microtubule-associated proteins. *Dev. Dyn.* **10**.1002.

Ran J., Luo Y., Zhang Y., Yang Y., Chen M., Liu M., Li D., Zhou J., **2017**. Phosphorylation of EB1 regulates the recruitment of CLIP-170 and p150glued to the plus ends of astral microtubules. *Oncotarget.* **7**;8(6):9858-9867.

- Rath O.** and Kozielski F., **2012**. Kinesins and cancer. *Nat. Rev. Cancer.* 24;**12**(8):527-39.
- Ray L.B.** and Sturgill T.W., **1988**. Insulin-stimulated microtubule-associated protein kinase is phosphorylated on tyrosine and threonine in vivo. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* **85**(11):3753-7.
- Reck-Peterson S.L.**, **2015**. Dynactin revealed. *Nat. Struct. Mol. Biol.* **22**(5):359-60.
- Reddy C.E.**, Albanito L., De Marco P., Aiello D., Maggiolini M., Napoli A., Musti A.M., **2013**. Multisite phosphorylation of c-Jun at threonine 91/93/95 triggers the onset of c-Jun pro-apoptotic activity in cerebellar granule neurons. *Cell Death Dis.* 10;**4**:e852.
- Redeker V.**, Levilliers N., Schmitter J.M., Le Caer J.P., Rossier J., Adoutte A., Bré M.H., **1994**. Polyglycylation of tubulin: a posttranslational modification in axonemal microtubules. *Science.* 9;**266**(5191):1688-91.
- Redeker V.**, Melki R., Promé D., Le Caer J.P., Rossier J., **1992**. Structure of tubulin C-terminal domain obtained by subtilisin treatment. The major alpha and beta tubulin isotypes from pig brain are glutamylated. *FEBS Lett.* 23;**313**(2):185-92.
- Reed N.A.**, Cai D., Blasius T.L., Jih G.T., Meyhofer E., Gaertig J., Verhey K.J., **2006**. Microtubule acetylation promotes kinesin-1 binding and transport. *Curr. Biol.* 7;**16**(21):2166-72.
- Reiner O.**, Gdalyahu A., Ghosh I., Levy T., Sapoznik S., Nir R., Sapir T., **2004**. DCX's phosphorylation by not just another kinase (JNK). *Cell Cycle.* **3**(6):747-51.
- Ren Y.**, Zhao J., Feng J., **2003**. Parkin binds to alpha/beta tubulin and increases their ubiquitination and degradation. *J. Neurosci.* 15;**23**(8):3316-24.
- Reszka A.A.**, Seger R., Diltz C.D., Krebs E.G., Fischer E.H., **1995**. Association of mitogen-activated protein kinase with the microtubule cytoskeleton. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* 12;**92**(19):8881-5.
- Richardson C.E.**, Spilker K.A., Cueva J.G., Perrino J., Goodman M.B., Shen K., **2014**. PTRN-1, a microtubule minus end-binding CAMSAP homolog, promotes microtubule function in *Caenorhabditis elegans* neurons. *Elife.* 25; **3**:e01498.
- Rickard J.E.** and Kreis T.E., **1990**. Identification of a novel nucleotide-sensitive microtubule-binding protein in HeLa cells. *J. Cell Biol.* **110**(5):1623-33.
- Rickard J.E.** and Kreis T.E., **1991**. Binding of pp170 to microtubules is regulated by phosphorylation. *J. Biol. Chem.* 15;**266**(26):17597-605.
- Rickard J.E.** and Kreis T.E., **1996**. CLIPs for organelle-microtubule interactions. *Trends Cell Biol.* **6**(5):178-83.
- Riehemann K.** and Sorg C., **1993**. Sequence homologies between four cytoskeleton-associated proteins. *Trends Biochem. Sci.* **18**(3):82-3.
- Risinger A.L.**, Giles F.J., Mooberry S.L., **2009**. Microtubule dynamics as a target in oncology. *Cancer Treat. Rev.* **35**(3):255-61.
- Roberts A.J.**, Kon T., Knight P.J., Sutoh K., Burgess S.A., **2013**. Functions and mechanics of dynein motor proteins. *Nat. Rev. Mol. Cell Biol.* **14**(11):713-26.
- Rogelio A.** and Lasso J.D., **2011**. The immortal life of Henrietta Lacks. *Book and Media Rev.* **305**(11).
- Rogers S.L.**, Rogers G.C., Sharp D.J., Vale R.D., **2002**. *Drosophila* EB1 is important for proper assembly, dynamics, and positioning of the mitotic spindle. *J. Cell Biol.* 2;**158**(5):873-84.

Rogowski K., Juge F., van Dijk J., Wloga D., Strub J.M., Levilliers N., Thomas D., Bré M.H., Van Dorsselaer A., Gaertig J., Janke C., **2009**. Evolutionary divergence of enzymatic mechanisms for posttranslational polyglycylation. *Cell*. 12;**137**(6):1076-87.

Rogowski K., van Dijk J., Magiera M.M, Bosc C., Deloulme J.C., Bosson A., Peris L., Gold N.D., Lacroix B., Bosch Grau M., Bec N., Larroque C., Desagher S., Holzer M., Andrieux A., Moutin M.J., Janke C., **2010**. A family of protein-deglutamylating enzymes associated with neurodegeneration. *Cell*. 12;**143**(4):564-78.

Romaniello R., Arrigoni F., Bassi M.T., Borgatti R., **2015**. Mutations in a- and b-tubulin encoding genes: implications in brain malformations. *Brain Dev.* **37**(3):273-80.

Roos J., DiGregorio P.J., Yeromin A.V., Ohlsen K., Lioudyno M., Zhang S., Safrina O., Kozak J.A., Wagner S.L., Cahalan M.D., Velicelebi G., Stauderman K.A., **2005**. STIM1, an essential and conserved component of store-operated Ca²⁺ channel function. *J. Cell Biol.* 9;**169**(3):435-45.

Roostalu J. and Surrey T., **2017**. Microtubule nucleation: beyond the template. *Nat. Rev. Mol. Cell Biol.* 23. **75**:1-9.

Rosas-Acosta G., Russell W.K., Deyrieux A., Russell D.H., Wilson V.G., **2005**. A universal strategy for proteomic studies of SUMO and other ubiquitin-like modifiers. *Mol. Cell Proteomics.* **4**(1):56-72.

Rouse J., Cohen P., Trigon S., Morange M., Alonso-Llamazares A., Zamanillo D., Hunt T., Nebreda A.R., **1994**. A novel kinase cascade triggered by stress and heat shock that stimulates MAPKAP kinase-2 and phosphorylation of the small heat shock proteins. *Cell*. 23;**78**(6):1027-37.

Rubin C.I. and Atweh G.F., **2004**. The role of stathmin in the regulation of the cell cycle. *J. Cell Biochem.* 1;**93**(2):242-50.

Rubinfeld B., Tice D.A., Polakis P., **2001**. Axin-dependent phosphorylation of the adenomatous polyposis coli protein mediated by casein kinase Iepsilon. *J. Biol. Chem.* 19;**276**(42):39037-45.

S

Sabapathy K., **2012**. Role of the JNK pathway in human diseases. *Prog. Mol. Biol. Transl. Sci.* **106**:145-69.

Sabapathy K., Hochedlinger K., Nam S.Y., Bauer A., Karin M., Wagner E.F., **2004**. Distinct roles for JNK1 and JNK2 in regulating JNK activity and c-Jun-dependent cell proliferation. *Mol. Cell.* 10;**15**(5):713-25.

Sabio G. and Davis R.J., **2014**. TNF and MAP kinase signaling pathways. *Semin. Immunol.* **26**(3):237-45.

Sahin U., Neumann F., Tureci O., Schmits R., Perez F., Pfreundschuh M., **2002**. Hodgkin and Reed-Sternberg cell-associated autoantigen CLIP-170/restin is a marker for dendritic cells and is involved in the trafficking of macropinosomes to the cytoskeleton, supporting a function-based concept of Hodgkin and Reed-Sternberg cells. *Blood*. 1;**100**(12):4139-45.

Salmela A.L. and Kallio M.J., **2013**. Mitosis as an anti-cancer drug target. *Chromosoma.* **122**(5):431-49.

Sánchez C., Díaz-Nido J., Avila J., **2000**. Phosphorylation of microtubule-associated protein 2 (MAP2) and its relevance for the regulation of the neuronal cytoskeleton function. *Prog. Neurobiol.* **61**(2):133-68.

- Sánchez-Huertas C.**, Freixo F., Viais R., Lacasa C., Soriano E., Lüders J., **2016**. Non-centrosomal nucleation mediated by augmin organizes microtubules in post-mitotic neurons and controls axonal microtubule polarity. *Nat. Commun.* 13;7:12187.
- Sanders A.A.** and Kaverina I., **2015**. Nucleation and dynamics of Golgi-derived microtubules. *Front. Neurosci.* 10;9:431.
- Sanhaji M.**, Friel C.T., Kreis N.N., Krämer A., Martin C., Howard J., Strebhardt K., Yuan J., **2010**. Functional and spatial regulation of mitotic centromere-associated kinesin by cyclin-dependent kinase 1. *Mol. Cell Biol.* 30(11):2594-607.
- Sano M.**, **1992**. Chromatographic resolution and characterization of a nerve growth factor-dependent kinase that phosphorylates microtubule-associated proteins 1 and 2 in PC12 cells. *J. Neurochem.* 59(4):1263-72.
- Sardar H.S.**, Luczak V.G., Lopez M.M., Lister B.C., Gilbert S.P., **2010**. Mitotic kinesin CENP-E promotes microtubule plus-end elongation. *Curr. Biol.* 28;20(18):1648-53.
- Sato S.**, Cerny R.L., Buescher J.L., Ikezu T., **2006**. Tau-tubulin kinase 1 (TTBK1), a neuron-specific tau kinase candidate, is involved in tau phosphorylation and aggregation. *J. Neurochem.* 98(5):1573-84.
- Scheel J.** and Kreis T.E., **1991**. Motor protein independent binding of endocytic carrier vesicles to microtubules in vitro. *J. Biol. Chem.* 25;266(27):18141-8.
- Scheel J.**, Pierre P., Richard J.E., Diamantopoulos G.S., Valetti C., van der Goot F.G., Häner M., Aebi U., Kreis T.E., **1999**. Purification and analysis of authentic CLIP-170 and recombinant fragments. *J. Biol. Chem.* 3;274(36):25883-91.
- Schmidt N.**, Basu S., Sladeczek S., Gatti S., van Haren J., Treves S., Pielage J., Galjart N., Brenner H.R., **2012**. Agrin regulates CLASP2-mediated capture of microtubules at the neuromuscular junction synaptic membrane. *J. Cell Biol.* 6;198(3):421-37.
- Schreck I.**, Al-Rawi M., Mingot J.M., Scholl C., Diefenbacher M.E., O'Donnell P., Bohmann D., Weiss C., **2011**. c-Jun localizes to the nucleus independent of its phosphorylation by and interaction with JNK and vice versa promotes nuclear accumulation of JNK. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 22;407(4):735-40.
- Schubart U.K.**, Yu J., Amat J.A., Wang Z., Hoffmann M.K., Edelmann W., **1996**. Normal development of mice lacking metablastin (P19), a phosphoprotein implicated in cell cycle regulation. *J. Biol. Chem.* 14;271(24):14062-6.
- Schuster M.**, Kilaru S., Ashwin P., Lin C., Severs N.J., Steinberg G., **2011**. Controlled and stochastic retention concentrates dynein at microtubule ends to keep endosomes on track. *EMBO J.* 16;30(4):652-64.
- Schuyler S.C.** and Pellman D., **2001**. Microtubule “plus-end-tracking proteins”: The end is just the beginning. *Cell.* 18;105(4):421-4.
- Sellin M.E.**, Holmfeldt P., Stenmark S., Gullberg M., **2008**. Global regulation of the interphase microtubule system by abundantly expressed Op18/stathmin. *Mol. Biol. Cell.* 19(7):2897-906.
- Sgrò F.**, Bianchi F.T., Falcone M., Pallavicini G., Gai M., Chiotto A.M., Berto G.E., Turco E., Chang Y.J., Huttner W.B., Di Cunto F., **2016**. Tissue-specific control of midbody microtubule stability by Citron kinase through modulation of TUBB3 phosphorylation. *Cell Death Differ.* 23(5):801-13.
- Sharp D.J.** and Ross J.L., **2012**. Microtubule-severing enzymes at the cutting edge. *J. Cell Sci.* 1;125(Pt 11):2561-9.

- Shaw D.**, Wang S.M., Villaseñor A.G., Tsing S., Walter D., Browner M.F., Barnett J., Kuglstatter A., **2008**. The crystal structure of JNK2 reveals conformational flexibility in the MAP kinase insert and indicates its involvement in the regulation of catalytic activity. *J. Mol. Biol.* 21;**383**(4):885-93.
- She Z.Y.** and Yang W.X., **2017**. Molecular mechanisms of kinesin-14 motors in spindle assembly and chromosome segregation. *J. Cell Sci.* 1;**130**(13):2097-2110.
- Sheeman B.**, Carvalho P., Sagot I., Geiser J., Kho D., Hoyt M.A., Pellman D., **2003**. Determinants of *S. cerevisiae* dynein localization and activation: implications for the mechanism of spindle positioning. *Curr. Biol.* 4;**13**(5):364-72.
- Sheffield P.J.**, Garrard S., Caspi M., Aoki J., Arai H., Derewenda U., Inoue K., Suter B., Reiner O., Derewenda Z.S., **2000**. Homologs of the alpha- and beta-subunits of mammalian brain platelet-activating factor acetylhydrolase Ib in the *Drosophila melanogaster* genome. *Proteins.* 1;**39**(1):1-8.
- Shemanko C.S.**, Sanghera J.S., Milner R.E., Pelech S., Michalak M., **1995**. Phosphorylation of the carboxyl terminal region of dystrophin by mitogen-activated protein (MAP) kinase. *Mol. Cell Biochem.* 8;**152**(1):63-70.
- Sheridan D.L.**, Kong Y., Parker S.A., Dalby K.N., Turk B.E., **2008**. Substrate discrimination among mitogen-activated protein kinases through distinct docking sequence motifs. *J. Biol. Chem.* 11;**283**(28):19511-20.
- Shiple K.**, Hekmat-Nejad M., Turner J., Moores C., Anderson R., Milligan R., Sakowicz R., Fletterick R., **2004**. Structure of a kinesin microtubule depolymerization machine. *EMBO J.* 7;**23**(7):1422-32.
- Shirakawa T.**, Kawazoe Y., Tsujikawa T., Jung D., Sato S., Uesugi M., **2011**. Deactivation of STAT6 through serine 707 phosphorylation by JNK. *J. Biol. Chem.* 4;**286**(5):4003-10.
- Singh S.A.**, Winter D., Bilimoria P.M., Bonni A., Steen H., Steen J.A., **2012**. FLEXIQinase, a mass spectrometry-based assay, to unveil multikinase mechanisms. *Nat. Methods.* 8;**9**(5):504-8.
- Sirajuddin M.**, Rice L.M., Vale R.D., **2014**. Regulation of microtubule motors by tubulin isotypes and post-translational modifications. *Nat. Cell Biol.* **16**(4):335-44.
- Slep K.C.**, **2009**. The role of TOG domains in microtubule plus end dynamics. *Biochem. Soc. Trans.* **37**(Pt 5):1002-6.
- Slep K.C.** and Vale R.D., **2007**. Structural basis of microtubule plus end tracking by XMAP215, CLIP-170, and EB1. *Mol. Cell.* 21;**27**(6):976-91.
- Slep K.C.**, Rogers S.L., Elliott S.L., Ohkura H., Kolodziej P.A., Vale R.D., **2005**. Structural determinants for EB1-mediated recruitment of APC and spectraplakins to the microtubule plus end. *J. Cell Biol.* 14;**168**(4):587-98.
- Slobodnick A.**, Shah B., Pillinger M.H., Krasnokutsky S., **2015**. Colchicine: old and new. *Am. J. Med.* **128**(5):461-70.
- Sluss H.K.**, Han Z., Barrett T., Goberdhan D.C., Wilson C., Davis R.J., Ip Y.T., **1996**. A JNK signal transduction pathway that mediates morphogenesis and an immune response in *Drosophila*. *Genes Dev.* 1;**10**(21):2745-58.
- Smith K.J.**, Johnson K.A., Bryan T.M., Hill D.E., Markowitz S., Willson J.K., Paraskeva C., Petersen G.M., Hamilton S.R., Vogelstein B., et al., **1993**. The APC gene product in normal and tumor cells. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* 1;**90**(7):2846-50.

- Solinas G.** and **Becattini B.**, **2016**. JNK at the crossroad of obesity, insulin resistance, and cell stress response. *Mol. Metab.* 8;**6**(2):174-184.
- Song Y.H.** and **Mandelkow E.**, **1993**. Recombinant kinesin motor domain binds to beta-tubulin and decorates microtubules with a B surface lattice. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* 1;**90**(5)1671-5.
- Song Y.**, **Kirkpatrick L.L.**, **Schilling A.B.**, **Helseth D.L.**, **Chabot N.**, **Keillor J.W.**, **Johnson G.V.**, **Brady S.T.**, **2013**. Transglutaminase and polyamination of tubulin: posttranslational modification for stabilizing axonal microtubules. *Neuron.* 10;**78**(1):109-23.
- Soppina V.**, **Herbstman J.F.**, **Skiniotis G.**, **Verhey K.J.**, **2012**. Luminal localization of α -tubuline K40 acetylation by cryo-EM analysis of fab-labeled microtubules. *PLoS One.* 7(10):e48204.
- Sousa A.**, **Reis R.**, **Sampaio P.**, **Sunkel C.E.**, **2007**. The Drosophila CLASP homologue, Mast/Orbit regulates the dynamic behavior of interphase microtubules by promoting the pause state. *Cell Motil. Cytoskeleton.* 64(8):605-20.
- Sprague G.F. Jr.**, **1998**. Control of MAP kinase signaling specificity or how not to go HOG wild. *Genes Dev.* 15;**12**(18):2817-20.
- Sproul L.R.**, **Anderson D.J.**, **Mackey A.T.**, **Saunders W.S.**, **Gilbert S.P.**, **2005**. Cik1 targets the minus-end kinesin depolymerase kar3 to microtubule plus ends. *Curr. Biol.* 9;**15**(15):1420-7.
- Stamer K.**, **Vogel R.**, **Thies E.**, **Mandelkow E.**, **Mandelkow E.M.**, **2002**. Tau blocks traffic of organelles, neurofilaments, and APP vesicles in neurons and enhances oxidative stress. *J. Cell Biol.* 18;**156**(6):1051-63.
- Stebbens S.** and **Wittmann T.**, **2012**. Targeting and transport: how microtubules control focal adhesion dynamics. *J. Cell Biol.* 20;**198**(4):481-9.
- Stebbens S.J.**, **Paterson A.D.**, **Crampton M.S.**, **Shewan A.M.**, **Ferguson C.**, **Akhmanova A.**, **Parton R.G.**, **Yap A.S.**, **2006**. Dynamic microtubules regulate the local concentration of E-cadherin at cell-cell contacts. *J. Cell Sci.* 1;**119**(Pt 9): 1801-11.
- Steinmetz M.O.**, **2007**. Structure and thermodynamics of the tubulin-stathmin interaction. *J. Struct. Biol.* 158(2):137-47.
- Steinmetz M.O.** and **Akhmanova A.**, **2008**. Capturing protein tails by CAP-Gly domains. *Trends Biochem. Sci.* 33(11):535-45.
- Steinmetz M.O.**, **Kammerer R.A.**, **Jahnke W.**, **Goldie K.N.**, **Lustig A.**, **van Oostrum J.**, **2000**. Op18/stathmin caps a kinked protofilament-like tubulin tetramer. *EMBO J.* 15;**19**(4):572-80.
- Stepanova T.**, **Smal I.**, **van Haren J.**, **Akinci U.**, **Liu Z.**, **Miedema M.**, **Limpens R.**, **van Ham M.**, **van der Reijden M.**, **Poot R.**, **Grosveld F.**, **Mommaas M.**, **Meijering E.**, **Galjart N.**, **2010**. History-dependent catastrophe catastrophes regulate axonal microtubule behavior. *Curr. Biol.* 8;**20**(11):1023-8.
- Stock M.F.**, **Guerrero J.**, **Cobb B.**, **Eggers C.T.**, **Huang T.G.**, **Li X.**, **Hackney D.D.**, **1999**. Formation of the compact conformation of kinesin requires a COOH-terminal heavy chain domain and inhibits microtubule-stimulated ATPase activity. *J. Biol. Chem.* 21;**274**(21):14617-23.
- Stout J.R.**, **Yount A.L.**, **Powers J.A.**, **Leblanc C.**, **Ems-McClung S.C.**, **Walczak C.E.**, **2011**. Kif18B interacts with EB1 and controls astral microtubule length during mitosis. *Mol. Biol. Cell.* 22(17):3070-80.
- Straube A.** and **Merdes A.**, **2007**. EB3 regulates microtubule dynamics at the cell cortex and is required for myoblast elongation and fusion. *Curr. Biol.* 7;**17**(15):1318-25.

Stumpff J., Wagenbach M., Franck A., Asbury C.L., Wordeman L., **2012**. Kif18A and chromokinesins confine centromere movements via microtubule growth suppression and spatial control of kinetochore tension. *Dev. Cell.* 15;**22**(5):1017-29.

Sturgill E.G. and Ohi R., **2013**. Microtubule-regulating kinesins. *Curr. Biol.* 4;**23**(21):R946-8.

Sturgill T.W. and Ray L.B., **1986**. Muscle proteins related to microtubule associated protein-2 are substrates for an insulin-stimulatable kinase. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 29;**134**(2):565-71.

Su L.K. and Qi Y., **2001**. Characterization of human MAPRE genes and their proteins. *Genomics.* 15;**71**(2):142-9.

Su L.K., Burrell M., Hill D.E., Gyuris J., Brent R., Wiltshire R., Trent J., Vogelstein B., Kinzler K.W., **1995**. APC binds to the novel protein EB1. *Cancer Res.* 15;**55**(14):2972-7.

Sui X., Kong N., Ye L., Han W., Zhou J., Zhang Q., He C., Pan H., **2014**. p38 and JNK MAPK pathways control the balance of apoptosis and autophagy in response to chemotherapeutic agents. *Cancer Lett.* 28;**344**(2):174-9.

Sulimenko V., Hájková Z., Klebanovych A., Dráber P., **2017**. Regulation of microtubule nucleation mediated by γ -tubulin complexes. *Protoplasma.* **254**(3):1187-1199.

Sun D., Leung C.L., Liem R.K., **2001**. Characterization of the microtubule binding domain of microtubule actin crosslinking factor (MACF): identification of a novel group of microtubule associated proteins. *J. Cell Sci.* **114**(Pt 1):161-172.

Sun T., Li Y., Li T., Ma H., Guo Y., Jiang X., Hou M., Huang S., Chen Z., **2017**. JIP1 and JIP3 cooperate to mediate TrKB anterograde axonal transport by activating kinesin-1. *Cell Mol. Life Sci.* 21;**74**:1-18

Sun X., Li D., Yang Y., Ren Y., Li J., Wang Z., Dong B., Liu M., Zhou J., **2012**. Microtubule-binding protein CLIP-170 is a mediator of paclitaxel sensitivity. *J. Pathol.* **226**(4):666-73.

Sun X., Li F., Dong B., Suo S., Liu M., Li D., Zhou J., **2013**. Regulation of tumor angiogenesis by the microtubule-binding protein CLIP-170. *Protein Cell.* **4**(4):266-76.

Sureda A., Domenech E., Schmitz N., Dreger P., Lymphoma Working Party of the European Group for Stem Cell Transplantation. **2014**. The role of allogeneic stem cell transplantation in Hodgkin's lymphoma. *Curr Treat Options Oncol.* **15**(2):238-47.

Suzuki K. and Takahashi K., **2008**. Regulation of lamellipodia formation and cell invasion by CLIP-170 in invasive human breast cancer cells. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 4;**368**(2):199-204.

Swiech L., Blazejczyk M., Urbanska M., Pietruszka P., Dortland B.R., Malik A.R., Wulf P.S., Hoogenraad C.C., Jaworski J., **2011**. CLIP-170 and IQGAP1 cooperatively regulate dendrite morphology. *J. Neurosci.* 23;**31**(12):4555-68.

Szul T. and Sztul E., **2011**. COPII and COPI traffic at the ER-Golgi interface. *Physiology (Bethesda).* **26**(5):348-64.

T

Tai C.Y., Dujardin D.L., Faulkner N.E., Vallee R.B., **2002**. Role of dynein, dynactin, and CLIP-170 interactions in LIS1 kinetochore function. *J. Cell Biol.* 18;**156**(6):959-68.

Tamura N. and Draviam V.M., **2012**. Microtubule plus-ends within a mitotic cell are 'moving platforms' with anchoring, signaling and force-coupling roles. *Open. Biol.* **2**(11):120132.

- Tanaka T.**, Iino M., Goto K., **2014**. Knockdown of Sec8 enhances the binding affinity of c-Jun N-terminal kinase (JNK)-interacting protein 4 for mitogen-activated protein kinase kinase 4 (MKK4) and suppresses the phosphorylation of MKK4, p38, and JNK, thereby inhibiting apoptosis. *FEBS J.* **281**(23):5237-50.
- Tanenbaum M.E.**, Galjart N., van Vugt M.A., Medema R.H., **2006**. CLIP-170 facilitates the formation of kinetochore-microtubule attachments. *EMBO J.* **11**;25(1):45-57.
- Tanenbaum M.E.**, Macůrek L., Galjart N., Medema R.H., **2008**. Dynein, Lis1 and CLIP-170 counteract EG5-dependent centrosome separation during bipolar spindle assembly. *EMBO J.* **17**;27(24):3235-45.
- Tanenbaum M.E.**, Macůrek L., van der Vaart B., Galli M., Akhmanova A., Medema R.H., **2011**. A complex of Kif18b and MCAK promotes microtubule depolymerization and is negatively regulated by Aurora kinases. *Curr. Biol.* **23**;21(16):1356-65.
- Tararuk T.**, Ostman N., Li W., Björklom B., Padzik A., Zdrojewska J., Hongisto V., Herdegen T., Konopka W., Courtney M.J., Coffey E.T., **2006**. JNK1 phosphorylation of SCG10 determines microtubule dynamics and axodendritic length. *J. Cell Biol.* **24**;173(2):265-77.
- Tarricone C.**, Perrina F., Monzani S., Massimiliano L., Kim M.H., Derewenda Z.S., Knapp S., Tsai L.H., Musacchio A., **2004**. Coupling PAF signaling to dynein regulation: structure of LIS1 in complex with PAF-acetylhydrolase. *Neuron.* **2**;44(5):809-21.
- Tegha-Dunghu J.**, Bausch E., Neumann B., Wuensche A., Walter T., Ellenberg J., Gruss O.J., **2014**. MAP1S controls microtubule stability throughout the cell cycle in human cells. *J. Cell Sci.* **1**;127(Pt 23):5007-13.
- Teixidó-Travesa N.**, Roig J., Lüders J., **2012**. The where, when and how of microtubule nucleation – one ring to rule them all. *J. Cell Sci.* **125**(Pt 19):4445-56.
- Terret M.E.**, Lefebvre C., Djiane A., Rassnier P., Moreau J., Maro B., Verlhac M.H., **2003**. DOC1R: a MAP kinase substrate that control microtubule organization of metaphase II mouse oocytes. *Development.* **130**(21):5169-77.
- Thiemann M.**, Schrader M., Völkl A., Baumgart E., Fahimi H.D., **2000**. Interaction of peroxisomes with microtubules. In vitro studies using a novel peroxisome-microtubule binding assay. *Eur. J. Biochem.* **267**(20):6264-75.
- Thoma C.R.**, Matov A., Gutbrodt K.L., Hoerner C.R., Smole Z., Krek W., Danuser G., **2010**. Quantitative image analysis identifies pVHL as a key regulator of microtubule dynamic instability. *J. Cell Biol.* **20**;190(6):991-1003.
- Ti S.C.**, Pamula M.C., Howes S.C., Duellberg C., Cade N.I., Kleiner R.E., Forth S., Surrey T., Nogales E., Kapoor T.M., **2016**. Mutations in human tubulin proximal to the kinesin-binding site alter dynamic instability at microtubule plus- and minus-ends. *Dev. Cell.* **4**;37(1):72-84.
- Tian G.**, Kong X.P., Jaglin X.H., Chelly J., Keays D., Cowan N.J., **2008**. A pachygyria-causing alpha-tubulin mutation results in inefficient cycling with CCT and a deficient interaction with TBCB. *Mol. Biol. Cell.* **19**(3):1152-61.
- Tian G.**, Jaglin X.H., Keays D.A., Francis F., Chelly J., Cowan N.J., **2010**. Disease-associated mutations in TUBA1A result in a spectrum of defects in the tubulin folding and heterodimer assembly pathway. *Hum. Mol. Genet.* **15**;19(18):3599-613.
- Tirnauer J.S.**, O'Toole E., Berrueta L., Bierer B.E., Pellman D., **1999**. Yeast Bim1p promotes the G1-specific dynamics of microtubules. *J. Cell Biol.* **31**;145(5):993-1007.

Tischfield M.A., Cederquist G.Y., Gupta M.L. Jr, Engle E.C., 2011. Phenotypic spectrum of the tubulin-related disorders and functional implications of disease-causing mutations. *Curr. Opin. Genet. Dev.* **21**(3):286-94.

Tokuraku K., Okuyama S., Matsushima K., Ikezu T., Kotani S., 2010. Distinct neuronal localization of microtubule-associated protein 4 in the mammalian brain. *Neurosci. Lett.* **29**;484(2):143-7.

Tolić I.M., 2017. Mitotic spindle: kinetochore fibers hold on tight to interpolar bundles. *Eur. Biophys. J.* **19**.

Tortosa E., Montenegro-Venegas C., Benoist M., Härtel S., González-Billault C., Esteban J.A., Avila J., 2011. Microtubule-associated protein 1B (MAP1B) is required for dendritic spine development and synaptic maturation. *J. Biol. Chem.* **25**;286(47):40638-48.

Tournebize R., Popov A., Kinoshita K., Ashford A.J., Rybina S., Pozniakovsky A., Mayer T.U., Walczak C.E., Karsenti E., Hyman A.A., 2000. Control of microtubule dynamics by the antagonistic activities of XMAP215 and XKCM1 in *Xenopus* egg extracts. *Nat. Cell Biol.* **2**(1):13-9.

Tournier C., 2013. The 2 faces of JNK signaling in cancer. *Genes Cancer.* **4**(9-10):397-400.

Tournier C., Hess P., Yang D.D., Xu J., Turner T.K., Nimnual A., Bar-Sagi D., Jones S.N., Flavell R.A., Davis R.J., 2000. Requirement of JNK for stress-induced activation of the cytochrome c-mediated death pathway. *Science.* **5**;288(5467):870-4.

Toya M., Kobayashi S., Kawasaki M., Shioi G., Kaneko M., Ishiuchi T., Misaki K., Meng W., Takeichi M., 2016. CAMSAP3 orients the apical-to-basal polarity of microtubule arrays in epithelial cells. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* **12**;113(2):332-7.

Tremplec N., Dave-Coll N., Nebreda A.R., 2013. SnapShot: p38 MAPK substrates. *Cell.* **14**;152(4):924-924.

Trinczek B., Biernat J., Baumann K., Mandelkow E.M., Mandelkow E., 1995. Domains of tau protein, differential phosphorylation, and dynamic instability of microtubules. *Mol. Biol. Cell.* **6**(12):1887-902.

Tropini C., Roth E.A., Zanic M., Gardner M.K., Howard J., 2012. Islands containing slowly hydrolyzable GTP analogs promote microtubule rescues. *PLoS One.* **7**(1):e30103.

Trueheart J., Boeke J.D., Fink G.R., 1987. Two genes required for cell fusion during yeast conjugation: evidence for a pheromone-induced surface protein. *Mol. Cell. Biol.* **7**(7):2316-28.

Tsai J.W., Bremner K.H., Vallee R.B., 2007. Dual subcellular roles for LIS1 and dynein in radial neuronal migration in live brain tissue. *Nat. Neurosci.* **10**(8):970-9.

Tsvetkov A.S., Samsonov A., Akhmanova A., Galjart N., Popov S.V., 2007. Microtubule-binding proteins CLASP1 and CLASP2 interact with actin filaments. *Cell Motil. Cytoskeleton.* **64**(7):519-30.

U

Udy D.B., Voorhies M., Chan P.P., Lowe T.M., Dumont S., 2015. Draft De Novo Transcriptome of the Rat Kangaroo *Potorous tridactylus* as a Tool for Cell Biology. *PLoS One.* **10**:e0134738.

Ule J., Jensen K.B., Ruggiu M., Mele A., Ule A., Darnell R.B., 2003. CLIP identifies Nova-regulated RNA networks in the brain. *Science.* **14**;302(5648):1212-5.

Usui T., Maekawa H., Pereira G., Schiebel E., 2003. The XMAP215 homologue Stu2 at yeast spindle pole bodies regulates microtubule dynamics and anchorage. *EMBO J.* **15**;22(18):4779-93.

V

- Vale R.D., 1991.** Severing of stable microtubules by a mitotically activated protein in *Xenopus* egg extracts. *Cell*. 22;**64**(4):827-39.
- Vale R.D. and Fletterick R.J., 1997.** The design plan of kinesin motors. *Annu. Rev. Cell Dev. Biol.* **13**:745-77.
- Valentine M.T., Fordyce P.M., Block S.M., 2006.** Eg5 steps it up! *Cell Div.* 15;**1**:31.
- Valetti C., Wetzel D.M., Schrader M., Hasbani M.J., Gill S.R., Kreis T.E., Schroer T.A., 1999.** Role of dynactin in endocytic traffic: effects of dynamitin overexpression and colocalization with CLIP-170. *Mol. Biol. Cell.* **10**(12):4107-20.
- Vallee R.B., McKenney R.J., Ori-McKenney K.M., 2012.** Multiple modes of cytoplasmic dynein regulation. *Nat. Cell Biol.* 29;**14**(3):224-30.
- Vallee R.B., Tai C., Faulkner N.E., 2001.** LIS1: cellular function of a disease-causing gene. *Trends Cell Biol.* **11**(4):155-60.
- van der Vaart B., Akhmanova A., Straube A., 2009.** Regulation of microtubule dynamic instability. *Biochem. Soc. Trans.* **37**(Pt 5):1007-13.
- van der Vaart B., Franker M.A., Kuijpers M., Hua S., Bouchet B.P., Jiang K., Grigoriev I., Hoogenraad C.C., Akhmanova A., 2012.** Microtubule plus-end tracking proteins SLAIN1/2 and chTOG promote axonal development. *J. Neurosci.* 17;**32**(42):14722-8.
- van der Vaart B., Manatschal C., Grigoriev I., Olieric V., Gouveia S.M., Bjelic S., Demmers J., Vorobjev I., Hoogenraad C.C., Steinmetz M.O., Akhmanova A., 2011.** SLAIN2 links microtubule plus end-tracking proteins and controls microtubule growth in interphase. *J. Cell Biol.* 13;**193**(6):1083-99.
- van der Vaart B., van Riel W.E., Doodhi H., Kevenaar J.T., Katrukha E.A., Gumy L., Bouchet B.P., Grigoriev I., Spangler S.A., Yu K.L., Wulf P.S., Wu J., Lansbergen G., van Battum E.Y., Pasterkamp R.J., Mimori-Kiyosue Y., Demmers J., Olieric N., Maly I.V., Hoogenraad C.C., Akhmanova A., 2013.** CFEOM1-associated kinesin KIF21A is a cortical microtubule growth inhibitor. *Dev. Cell.* 28;**27**(2):145-60.
- Vandeweyer G., Van der Aa N., Reyniers E., Kooy R.F., 2012.** The contribution of CLIP2 haploinsufficiency to the clinical manifestations of the Williams-Beuren syndrome. *Am. J. Hum. Genet.* 8;**90**(6):1071-8.
- van Dijk J., Rogowski K., Miro J., Lacroix B., Eddé B., Janke C., 2007.** A targeted multienzyme mechanism for selective microtubule polyglutamylation. *Mol. Cell.* 11;**26**(3):437-48.
- van Hagen J.M., van der Geest J.N., van der Giessen R.S., Lagers-van Haselen G.C., Eussen H.J., Gille J.J., Govaerts L.C., Wouters C.H., de Coo I.F., Hoogenraad C.C., Koekkoek S.K., Frens M.A., van Camp N., van der Linden A., Jansweijer M.C., Thorgeirsson S.S., De Zeeuw C.I., 2007.** Contribution of CYLN2 and GTF2IRD1 to neurological and cognitive symptoms in Williams Syndrome. *Neurobiol Dis.* **26**(1):112-24.
- Varga V., Helenius J., Tanaka K., Hyman A.A., Tanaka T.U., Howard J., 2006.** Yeast kinesin-8 depolymerizes microtubules in a length-dependent manner. *Nat. Cell Biol.* **8**(9):957-62.
- Varga V., Leduc C., Bormuth V., Diez S., Howard J., 2009.** Kinesin-8 motors act cooperatively to mediate length-dependent microtubule depolymerization. *Cell.* 18;**138**(6):1174-83.

Vasquez R.J., Gard D.L., Cassimeris L., 1994. XMAP from *Xenopus* eggs promotes rapid plus end assembly of microtubules and rapid microtubule polymer turnover. *J. Cell Biol.* **127**(4):985-93.

Vaughan K.T., Tynan S.H., Faulkner N.E., Echeverri C.J., Vallee R.B., 1999. Colocalization of cytoplasmic dynein with dynactin and CLIP-170 at microtubule distal ends. *J. Cell Sci.* **112**(Pt 10):1437-47.

Vaughan P.S., Miura P., Henderson M., Byrne B., Vaughan K.T., 2002. A role for regulated binding of p150(Glued) to microtubule plus ends in organelle transport. *J. Cell Biol.* **22**;158(2):305-19.

Vemu A., Atherton J., Spector J.O., Moores C.A., Roll-Mecak A., 2017. Tubulin isoform composition tunes microtubule dynamics. *Mol. Biol. Cell.* **11**.

Ventura J.J., Hübner A., Zhang C., Flavell R.A., Shokat K.M., Davis R.J., 2006. Chemical genetic analysis of the time course of signal transduction by JNK. *Mol. Cell.* **3**;21(5):701-10.

Vera J.C., Rivas C.I., Maccioni R.B., 1989. Biochemical dissection of the role of the one-kilodalton carboxyl-terminal moiety of tubulin in its assembly into microtubules. *Biochemistry.* **10**;28(1):333-9.

Verhey K.J. and Gaertig J., 2007. The tubulin code. *Cell cycle.* **1**;6(17):2152-60.

Verhey K.J., Meyer D., Deehan R., Blenis J., Schnapp B.J., Rapoport T.A., Margolis B., 2001. Cargo of kinesin identified as JIP scaffolding proteins and associated signaling molecules. *J. Cell Biol.* **5**;152(5):959-70.

W

Wade R.H. and Hyman A.A., 1997. Microtubule structure and dynamics. *Curr. Opin. Cell Biol.* **9**(1):12-17.

Waight A.B., Bargsten K., Doronina S., Steinmetz M.O., Sussman D., Prota A.E., 2016. Structural basis of microtubule destabilization by potent auristatin anti-mitotics. *PLoS One.* **12**;11(8):e0160890.

Walker R.A., O'Brien E.T., Pryer N.K., Soboeiro M.F., Voter W.A., Erickson H.P., Salmon E.D., 1988. Dynamic instability of individual microtubules analyzed by video light microscopy: rate constants and transition frequencies. *J. Cell Biol.* **107**(4):1437-48.

Wan X., O'Quinn R.P., Pierce H.L., Joglekar A.P., Gall W.E., DeLuca J.G., Carroll C.W., Liu S.T., Yen T.J., McEwen B.F., Stukenberg P.T., Desai A., Salmon E.D., 2009. Protein architecture of the human kinetochore microtubule attachment site. *Cell.* **15**;137(4):672-84.

Wandke C., Barisic M., Sigl R., Rauch V., Wolf F., Amaro A.C., Tan C.H., Pereira A.J., Kutay U., Maiato H., Meraldi P., Geley S., 2012. Human chromokinesins promote chromosome congression and spindle microtubule dynamics during mitosis. *J. Cell Biol.* **3**;198(5):847-63.

Wang H., Liu B., Zhang C., Peng G., Liu M., Li D., Gu F., Chen Q., Dong J.T., Fu L., Zhou J., 2009. Parkin regulates paclitaxel sensitivity in breast cancer via a microtubule-dependent mechanism. *J. Pathol.* **218**(1):76-85.

Wang J., Kuitatse I., Lee A.V., Pan J., Giuliano A., Cui X., 2010. Sustained c-Jun-NH2-kinase activity promotes epithelial-mesenchymal transition, invasion, and survival of breast cancer cells by regulating extracellular signal-regulated kinase activation. *Mol. Cancer Res.* **8**(2):266-77.

Wang J., Liu G., Li Q., Wang F., Xie F., Zhai R., Guo Y., Chen T., Zhang N., Ni W., Yuan H., Tai G., 2015. Mucin1 promotes the migration and invasion of hepatocellular carcinoma cells via JNK-mediated phosphorylation of Smad2 at the C-terminal and linker regions. *Oncotarget.* **7**;6(22):19264-78.

- Wang Z.** and Sheetz M.P., **2000**. The C-terminus of tubulin increases cytoplasmic dynein and kinesin processivity. *Biophys. J.* **78**(4):1955-64.
- Wani M.C.**, Taylor H.L., Wall M.E., Coggon P., McPhail A.T., **1971**. Plant antitumor agents. VI. The isolation and structure of taxol, a novel antileukemic and antitumor agent from *Taxus brevifolia*. *J. Am. Chem. Soc.* **93**(9):2325-7.
- Watanabe T.**, Noritake J., Kakeno M., Matsui T., Harada T., Wang S., Itoh N., Sato K., Matsuzawa K., Iwamatsu A., Galjart N., Kaibuchi K., **2009**. Phosphorylation of CLASP2 by GSK-3 β regulates its interaction with IQGAP1, EB1 and microtubules. *J. Cell Sci.* **122**(Pt 16):2969-79.
- Waters K.M.**, Cummings B.S., Shankaran H., Scholpa N.E., Weber T.J., **2014**. ERK oscillation-dependent gene expression patterns and deregulation by stress response. *Chem. Res. Toxicol.* **27**(9):1496-503.
- Watson P.** and Stephens S.J., **2006**. Microtubule plus-end loading of p150(Glued) is mediated by EB1 and CLIP-170 but is not required for intracellular membrane traffic in mammalian cells. *J. Cell Sci.* **119**(Pt 13):2758-67.
- Wehenkel A.** and Janke C., **2014**. Towards elucidating the tubulin code. *Nat. Cell Biol.* **16**(4):303-5.
- Weir J.R.**, Faesen A.C., Klare K., Petrovic A., Basilico F., Fischböck J., Pentakota S., Keller J., Pesenti M.E., Pan D., Vogt D., Wohlgemuth S., Herzog F., Musacchio A., **2016**. Insights from biochemical reconstitution into the architecture of human kinetochores. *Nature.* **537**(7619):249-253.
- Weisbrich A.**, Honnappa S., Jaussi R., Okhrimenko O., Frey D., Jelesarov I., Akhmanova A., Steinmetz M.O., **2007**. Structure-function relationship of CAP-Gly domains. *Nat. Struct. Mol. Biol.* **14**(10):959-67.
- Wen Y.**, Eng C.H., Schmoranzler J., Cabrera-Poch N., Morris E.J., Chen M., Wallar B.J., Alberts A.S., Gundersen G.G., **2004**. EB1 and APC bind to mDia to stabilize microtubules downstream of Rho and promote cell migration. *Nat. Cell Biol.* **6**(9):820-30.
- Weng J.H.**, Liang M.R., Chen C.H., Tong S.K., Huang T.C., Lee S.P., Chen Y.R., Chen C.T., Chung B.C., **2013**. Pregnenolone activates CLIP-170 to promote microtubule growth and cell migration. *Nat. Chem. Biol.* **9**(10):636-42.
- Westermann S.** and Weber K., **2003**. Post-translational modifications regulate microtubule function. *Nat. rev. Mol. Cell Biol.* **4**(12):938-47.
- Weston C.R.** and Davis R.J., **2007**. The JNK signal transduction pathway. *Curr. Opin. Cell Biol.* **19**(2):142-9.
- Whisenant T.C.**, Ho D.T., Benz R.W., Rogers J.S., Kaake R.M., Gordon E.A., Huang L., Baldi P., Bardwell L., **2010**. Computational prediction and experimental verification of new MAP kinase docking sites and substrates including Gli transcription factors. *PLoS Comput. Biol.* **6**(8):e1000908.
- Whitmarsh A.J.**, **2006**. The JIP family of MAPK scaffold proteins. *Biochem. Soc. Trans.* **34**(Pt 5):828-32.
- Vicente J.J.** and Wordeman L., **2015**. Mitosis, microtubule dynamics and the evolution of kinesins. *Exp. Cell Res.* **334**(1):61-9.
- Wickstead B.** and Gull K., **2007**. Dyneins across eukaryotes: a comparative genomic analysis. *Traffic.* **8**(12):1708-21.

Wickström S.A., Masoumi K.C., Khochbin S., Fässler R., Massoumi R., 2010. CYLD negatively regulates cell-cycle progression by inactivating HDAC6 and increasing the levels of acetylated tubulin. *EMBO J.* 6;**29**(1):131-44.

Wieland G., Orthaus S., Ohndorf S., Diekmann S., Hemmerich P., 2004. Functional complementation of human centromere protein A (CENP-A) by Cse4p from *Saccharomyces cerevisiae*. *Mol. Cell Biol.* **24**(15):6620-30.

Wittmann T., 2008. EBs clip CLIPs to growing microtubule ends. *J. Cell Biol.* 29;**183**(7):1183-5.

Wittmann T. and Desai A., 2005. Microtubule cytoskeleton: a new twist at the end. *Curr. Biol.* 22;**15**(4):R126-9.

Wittmann T. and Waterman-Storer C.M., 2005. Spatial regulation of CLASP affinity for microtubules by Rac1 and GSK3beta in migrating epithelial cells. *J. Cell Biol.* 20;**169**(6):929-39.

Wloga D. and Gaertig J., 2010. Post-translational modifications of microtubules. *J. Cell Sci.* 15;**123**(Pt 20):3447-55.

Wloga D., Rogowski K., Sharma N., van Dijk J., Janke C., Eddé B., Bré M.H., Levilliers N., Redeker V., Duan J., Gorovsky M.A., Jerka-Dziadosz M., Gaertig J., 2008. Glutamylation on alpha-tubulin is not essential but affects the assembly and functions of a subset of microtubules in *Tetrahymena thermophila*. *Eukaryot. Cell.* **7**(8):1362-72.

Wloga D., Webster D.M., Rogowski K., Bré M.H., Levilliers N., Jerka-Dziadosz M., Janke C., Dougan S.T., Gaertig J., 2009. TTLL3 is a tubulin glycine ligase that regulates the assembly of cilia. *Dev. Cell.* **16**(6):867-76.

Wolyniak M.J., Blake-Hodek K., Kosco K., Hwang E., You L., Huffaker T.C., 2006. The regulation of microtubule dynamics in *Saccharomyces cerevisiae* by three interacting plus-end tracking proteins. *Mol. Biol. Cell.* **17**(6):2789-98.

Wong C.C., Xu T., Rai R., Bailey A.O., Yates J.R. 3rd, Wolf Y.I., Zebroski H., Kashina A., 2007. Global analysis of posttranslational protein arginylation. *PLoS Biol.* **5**(10):e258.

Woźniak M.J., Bola B., Brownhill K., Yang Y.C., Levakova V., Allan V.J., 2009. Role of kinesin-1 and cytoplasmic reticulum movement in VERO cells. *J. Cell Sci.* 15;**122**(Pt 12):1979-89.

Wu J.J. and Bennett A.M., 2005. Essential role for mitogen-activated protein (MAP) kinase phosphatase-1 in stress-responsive MAP kinase and cell survival signaling. *J. Biol. Chem.* 22;**280**(16):16461-6.

Wu M.M., Luik R.M., Lewis R.S., 2007. Some assembly required: constructing the elementary units of store-operated Ca²⁺ entry. *Cell Calcium.* **42**(2):163-72.

Wu X., Shen Q.T., Oristian D.S., Lu C.P., Zheng Q., Wang H.W., Fuchs E., 2011. Skin stem cells orchestrate directional migration by regulating microtubule-ACF7 connections through GSK3β. *Cell.* 4;**144**(3):341-52.

Wu X., Xiang X., Hammer J.A. 3rd., 2006. Motor proteins at the microtubule plus-end. *Trends Cell Biol.* **16**(3):135-43.

X

Xia Z., Dickens M., Raingeaud J., Davis R.J., Greenberg M.E., 1995. Opposing effects of ERK and JNK-p38 MAP kinases on apoptosis. *Science.* 24;**270**(5240):1326-31.

Xiao H., El Bissati K., Verdier-Pinard P., Burd B., Zhang H., Kim K., Fiser A., Angeletti R.H., Weiss L.M., 2010. Post-translational modifications to *Toxoplasma gondii* alpha- and beta-tubulins include novel C-terminal methylation. *J. Proteome Res.* **9**(1):359-72.

Xie S. and Zhou J., 2017. Harnessing plant biodiversity for the discovery of novel anticancer drugs targeting microtubules. *Front. Plant Sci.* **4**;8:720.

Xie S., Dong B., Sun X., Tala, He X., Zhou J., Liu M., Li D., 2014. Identification of a cytoplasmic linker protein as a potential target for neovascularization. *Atherosclerosis.* **233**(2):403-9.

Xie X., Gu Y., Fox T., Coll J.T., Fleming M.A., Markland W., Caron P.R., Wilson K.P., Su M.S., 1998. Crystal structure of JNK3: a kinase implicated in neuronal apoptosis. *Structure.* **15**;6(8):983-91.

Xue L., Wang P., Cao P., Zhu J.K., Tao W.A., 2014. Identification of extracellular signal-regulated kinase 1 (ERK1) direct substrates using stable isotope labeled kinase assay-linked phosphoproteomics. *Mol. Cell Proteomics.* **13**(11):3199-210.

Y

Yan S., Hou G., Schwieters C.D., Ahmed S., Williams J.C., Polenova T., 2013. Three-dimensional structure of CAP-gly domain of mammalian dynactin determined by magic angle spinning NMR spectroscopy: conformational plasticity and interactions with end-binding proteins EB1. *J. Mol. Biol.* **15**;425(22):4249-66.

Yan X., Habedanck R., Nigg E.A., 2006. A complex of two centrosomal proteins, CAP350 and FOP, cooperates with EB1 in microtubule anchoring. *Mol. Biol. Cell.* **17**(2):634-44.

Yang Y. and Zhou J., 2016. CYLD – a deubiquitylase that acts to fine-tune microtubule properties and functions. *J. Cell Sci.* **15**;129(12):2289-95.

Yang D.D., Conze D., Whitmarsh A.J., Barrett T., Davis R.J., Rincón M., Flavell R.A., 1998. Differentiation of CD4+ T cells to Th1 cells requires MAP kinase JNK2. *Immunity.* **9**(4):575-85.

Yang G., Liu Y., Yang K., Liu R., Zhu S., Coquinco A., Wen W., Kojic L., Jia W., Cynader M., 2012. Isoform-specific palmitoylation of JNK regulates axonal development. *Cell Death Differ.* **19**(4):553-61.

Yang X., Li H., Liu X.S., Deng A., Liu X., 2009. Cdc2-mediated phosphorylation of CLIP-170 is essential for its inhibition of centrosome reduplication. *J. Biol. Chem.* **16**;284(42):28775-82.

Yarza R., Vela S., Solas M., Ramirez M.J., 2016. c-Jun N-terminal Kinase (JNK) signaling as a therapeutic target for Alzheimer's disease. *Front. Pharmacol.* **12**;6:321.

Yates A., Akanni W., Amode M.R., Barrell D., Billis K., Carvalho-Silva D., Cummins C., Clapham P., Fitzgerald S., Gil L., Girón C.G., Gordon L., Hourlier T., Hunt S.E., Janacek S.H., Johnson N., Juettemann T., Keenan S., Lavidas I., Martin F.J., Maurel T., McLaren W., Murphy D.N., Nag R., Nuhn M., Parker A., Patricio M., Pignatelli M., Rahtz M., Riat H.S., Sheppard D., Taylor K., Thormann A., Vullo A., Wilder S.P., Zadissa A., Birney E., Harrow J., Muffato M., Perry E., Ruffier M., Spudich G., Trevanion S.J., Cunningham F., Aken B.L., Zerbino D.R., Flicek P., 2016. Ensembl 2016. *Nucleic Acids Res.* **4**;44(D1):D710-6.

Yau K.W., van Beuningen S.F., Cunha-Ferreira I., Cloin B.M., van Battum E.Y., Will L., Schätzle P., Tas R.P., van Krugten J., Katrukha E.A., Jiang K., Wulf P.S., Mikhaylova M., Harterink M., Pasterkamp R.J., Akhmanova A., Kapitein L.C., Hoogenraad C.C., 2014. Microtubule minus-end binding protein CAMSAP2 controls axon specification and dendrite development. *Neuron.* **4**;82(5):1058-73.

Yip Y.Y., Yeap Y.Y., Bogoyevitch M.A., Ng D.C., 2014. Differences in c-Jun N-terminal kinase recognition and phosphorylation of closely related stathmin-family members. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 28;**446**(1):248-54.

Yoon S. and Seger R., 2006. The extracellular signal-regulated kinase: multiple substrates regulate diverse cellular functions. *Growth Factors.* **24**(1):21-44.

Yoshida H., Hastie C.J., McLauchlan H., Cohen P., Goedert M., 2004. Phosphorylation of microtubule-associated protein tau by isoforms of c-Jun N-terminal kinase (JNK). *J. Neurochem.* **90**(2):352-8.

Yoshida N., Haga K., Haga T., 2003. Identification of sites of phosphorylation by G-protein-coupled receptor kinase 2 in beta-tubulin. *Eur. J. Biochem.* **270**(6):1154-63.

You H., Lei P., Andreadis S.T., 2013. JNK is a novel regulator of intracellular adhesion. *Tissue Barriers.* 1;**1**(5)e26845.

Yu I., Garnham C.P., Roll-Mecak A., 2015. Writing and reading the tubulin code. *J. Biol. Chem.* **10**;**290**(28):17163-72.

Yvon A.M. and Wadsworth P., 1997. Non-centrosomal microtubule formation and measurement of minus end microtubule dynamics in A498 cells. *J. Cell Sci.* **110**(Pt 19):2391-401.

Z

Zama T., Aoki R., Kamimoto T., Inoue K., Ikeda Y., Hagiwara M., 2002. Scaffold role of a mitogen-activated protein kinase phosphatase, SKRP1, for the JNK signaling pathway. *J. Biol. Chem.* **28**;**277**(26):23919-26.

Zambito A.M. and Wolff J., 1997. Palmitoylation of tubulin. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* **29**;**239**(3):650-4.

Zanic M., Wildund P.O., Hyman A.A., Howard J., 2013. Synergy between XMAP215 and EB1 increases microtubule growth rates to physiological levels. *Nat. Cell Biol.* **15**(6):688-93.

Zecevic M., Catling A.D., Eblen S.T., Renzi L., Hittle J.C., Yen T.J., Gorbsky G.J., Weber M.J., 1998. Active MAP kinase in mitosis: localization at kinetochores and association with the motor protein CENP-E. *J. Cell Biol.* **21**;**142**(6):1547-58.

Zehorai E. and Seger R., 2014. Beta-like importins mediate the nuclear translocation of mitogen-activated protein kinases. *Mol. Cell Biol.* **34**(2):259-70.

Zehorai E., Yao Z., Plotnikov A., Seger R., 2010. The subcellular localization of MEK and ERK—a novel nuclear translocation signal (NTS) paves a way to the nucleus. *Mol. Cell Endocrinol.* **27**;**314**(2):213-20.

Zeke A., Misheva M., Reményi A., Bogoyevitch M.A., 2016. JNK signaling: regulation and functions based on complex protein-protein partnerships. *Microbiol. Mol. Biol. Rev.* **27**;**80**(3):793-835.

Zhan X., Kook S., Gurevich E.V., Gurevich V.V., 2014. Arrestin-dependent activation of JNK family kinases. *Handb. Exp. Pharmacol.* **219**:259-80.

Zhang C., Zhang J., Li X., Sun N., Yu R., Zhao B., Yu D., Cheng Y., Liu Y., 2015. Huair aqueous extract induces hepatocellular carcinoma cells arrest in S phase via JNK signaling pathway. *Evid Based Complement Alternat Med.* **2015**:171356.

Zhang L. and Shay J.W., 2017. Multiple roles of APC and its therapeutic implications in colorectal cancer. *J. Natl. Cancer Inst.* **1**;**109**(8).

Zhang L., Shao H., Huang Y., Yan F., Chu Y., Hou H., Zhu M., Fu C., Aikhionbare F., Fang G., Ding X., Yao X., **2011**. PLK1 phosphorylates mitotic centromere-associated kinesin and promotes its depolymerase activity. *J. Biol. Chem.* 28;**286**(4):3033-46.

Zhang L., Shao H., Zhu T., Xia P., Wang Z., Liu L., Yan M., Hill D.L., Fang G., Chen Z., Wang D., Yao X., **2013**. DDA3 associates with microtubule plus ends and orchestrates microtubule dynamics and directional cell migration. *Sci. Rep.* **3**:1681.

Zhang Y., Liu G., Dong Z., **2001**. MSK1 and JNKs mediate phosphorylation of STAT3 in UVA-irradiated mouse epidermal JB6 cells. *J. Biol. Chem.* 9;**276**(45):42534-42.

Zhao H.F., Wang J., Tony To S.S., **2015**. The phosphatidylinositol 3-kinase/Akt and c-Jun N-terminal kinase signaling in cancer: Alliance or contradiction? (Review). *Int. J. Oncol.* **47**(2):429-36.

Zhao K.W., Li D., Zhao Q., Huang Y., Silverman R.H., Sims P.J., Chen G.Q., **2005**. Interferon-alpha-induced expression of phospholipid scramblase 1 through STAT1 requires the sequential activation of protein kinase Cdelta and JNK. *J. Biol. Chem.* 30;**280**(52):42707-14.

Zheng B., Fiumara P., Li Y.V., Georgakis G., Snell V., Younes M., Vauthey J.N., Carbone A., Younes A., **2003**. MEK/ERK pathway is aberrantly active in Hodgkin disease: a signaling pathway shared by CD30, CD40, and RANK that regulates cell proliferation and survival. *Blood.* 1;**102**(3):1019-27.

Zhou G., Bao Z.Q., Dixon J.E., **1995**. Components of a new human protein kinase signal transduction pathway. *J. Biol. Chem.* 26;**270**(21):12665-9.

Zhu C., Zhao J., Bibikova M., Leveson J.D., Bossy-Wetzel E., Fan J.B., Abraham R.T., Jiang W., **2005**. Functional analysis of human microtubule-based motor proteins, the kinesins and dyneins, in mitosis/cytokinesis using RNA interference. *Mol. Biol. Cell.* **16**(7):3187-99.

Zhu X. and Kaverina I., **2013**. Golgi as an MTOC: making microtubules for its own good. *Histochem. Cell Biol.* **140**(3):361-7.

Zimniak T., Stengl K., Mechtler K., Westermann S., **2009**. Phosphoregulation of the budding yeast EB1 homologue Bim1p by Aurora/Ipl1p. *J. Cell. Biol.* 10;**186**(3):379-91.

Zumbrunn J., Kinoshita K., Hyman A.A., Näthke I.S., **2001**. Binding of the adenomatous polyposis coli protein to microtubules increases microtubule stability and is regulated by GSK3 beta phosphorylation. *Curr. Biol.* 9;**11**(1):44-9.

Sites internet

HeLa (ATCC® CCL-2™) [consulté le 28-09-2017]
https://www.lgcstandards-atcc.org/products/all/CCL-2.aspx?geo_country=fr
http://web.expasy.org/cellosaurus/CVCL_0030

PtK2 (NBL-5) (ATCC® CCL-56™) [consulté le 28-09-2017]
https://www.lgcstandards-atcc.org/Products/Cells_and_Microorganisms/By_Tissue/Kidney/CCL-56
http://web.expasy.org/cellosaurus/CVCL_0514

RPE1 (ATCC® CRL-4000™) [consulté le 28-09-2017]
<https://www.lgcstandards-atcc.org/Products/All/CRL-4000.aspx>
http://web.expasy.org/cellosaurus/CVCL_4388

Kit de mutagenèse dirigée : QuickChange® Lightning Site-directed, Agilent technologies [consulté le 29-09-2017] <http://www.agilent.com/cs/library/usermanuals/Public/210518.pdf>

ThermoFisher SCIENTIFIC [consulté le 29-09-2017]

<https://www.thermofisher.com/fr/fr/home/life-science/protein-biology/protein-biology-learning-center/protein-biology-resource-library/pierce-protein-methods/co-immunoprecipitation-co-ip.html>

GST-JNK1 α 1 – Sigma-Aldrich® [consulté le 29-09-2017]

<http://www.sigmaaldrich.com/catalog/product/sigma/j2455?lang=fr®ion=FR>

Annexes

Domaine d'interaction de CLIP-170	Partenaires protéiques	Références
Partie N-terminale – H1 (domaines CAP-Gly)	Tubuline	Riehemann and Sorg, 1993 ; Pierre <i>et al.</i> , 1994 ; Diamantopoulos <i>et al.</i> , 1999 ; Perez <i>et al.</i> , 1999 ; Arnal <i>et al.</i> , 2004 ; Folker <i>et al.</i> , 2005 ; Ligon <i>et al.</i> , 2006 ; Peris <i>et al.</i> , 2006 ; Weisbrich <i>et al.</i> , 2007 ; Mishima <i>et al.</i> , 2007 ; Slep and Vale, 2007 ; Bieling <i>et al.</i> , 2008 ; Gupta <i>et al.</i> , 2009 ; Gupta <i>et al.</i> , 2010
Partie N-terminale – H1 (domaines CAP-Gly)	EBs (+TIP)	Bu and Su, 2003 ; Folker <i>et al.</i> , 2005 ; Komarova <i>et al.</i> , 2005 ; Ligon <i>et al.</i> , 2006 ; Weisbrich <i>et al.</i> , 2007 ; Mishima <i>et al.</i> , 2007 ; Akhmanova and Steinmetz, 2008 ; Bieling <i>et al.</i> , 2008 ; Gupta <i>et al.</i> , 2009 ; Dixit <i>et al.</i> , 2009 ; Gupta <i>et al.</i> , 2010 ; van der Vaart <i>et al.</i> , 2011 ; Ran <i>et al.</i> , 2017
Partie N-terminale – H1 (domaines CAP-Gly)	SLAIN2 (+TIP)	van der Vaart <i>et al.</i> , 2011
Partie N-terminale – H1	IQGAP1	Fukata <i>et al.</i> , 2002 ; Suzuki and Takahashi, 2008 ; Swiech <i>et al.</i> , 2011
Partie N-terminale – 2 ^{ème} et 3 ^{ème} Ser-rich (Ser195 et Ser312)	Plk1 (kinase)	Li <i>et al.</i> , 2010 ; Kakeno <i>et al.</i> , 2014
Partie N-terminale – 3 ^{ème} Ser-rich (Thr287)	Cdk1/Cdc2 (kinase)	Yang <i>et al.</i> , 2009 ; Amin <i>et al.</i> , 2014
Partie N-terminale – 3 ^{ème} Ser-rich (Ser312)	AMPK (kinase)	Nakano <i>et al.</i> , 2010
Partie N-terminale – 3 ^{ème} Ser-rich (S310, 312, 314, 320, 321)	PKA (kinase)	Lee <i>et al.</i> , 2010 ; Nirsch <i>et al.</i> , 2016
Partie N-terminale – 3 ^{ème} Ser-rich (S312)	PRK/PKN1/3 (kinase)	Collazos <i>et al.</i> , 2011
Partie centrale (domaine <i>coiled-coil</i>)	CLASP1/2 (+TIP)	Akhmanova <i>et al.</i> , 2001 ; Akhmanova and Steinmetz, 2008 ; Kumar <i>et al.</i> , 2009 ; van der Vaart <i>et al.</i> , 2011
Partie centrale (motif FEED-like dans le domaine <i>coiled-coil</i>)	Formins (mDial) (+TIP)	Lewkowicz <i>et al.</i> , 2008 ; Henty-Ridilla <i>et al.</i> , 2016
Partie centrale (domaine <i>coiled-coil</i> ; S1158 ?)	mTOR (kinase)	Choi <i>et al.</i> , 2002 ; Hsu <i>et al.</i> , 2011 ; Swietch <i>et al.</i> , 2011
Partie centrale (domaine <i>coiled-coil</i> ; S1318)	CK2 (kinase)	Li <i>et al.</i> , 2010
Partie centrale et C-terminale (domaines <i>coiled-coil</i> et doigt de zinc)	HDAC6	Li <i>et al.</i> , 2014
Partie C-terminale (motifs doigt de zinc)	CLIP-170 (+TIP)	Lansbergen <i>et al.</i> , 2004 ; Mishima <i>et al.</i> , 2007 ; Akhmanova and Steinmetz, 2008 ; Lee <i>et al.</i> , 2010 ; van der Vaart <i>et al.</i> , 2011
Partie C-terminale (motifs doigt de zinc)	LIS1 (+TIP)	Coquelle <i>et al.</i> , 2002 ; Tai <i>et al.</i> , 2002 ; Lansbergen <i>et al.</i> , 2004 ; Akhmanova and Steinmetz, 2008
Partie C-terminale (motifs doigt de zinc)	p150 ^{Glued} (+TIP)	Holzbaur <i>et al.</i> , 1991 ; Valetti <i>et al.</i> , 1999 ; Vaughan <i>et al.</i> , 2002 ; Lansbergen <i>et al.</i> , 2004 ; Wittman and Desai, 2005 ; Watson and Stephens, 2006 ; Weisbrich <i>et al.</i> , 2007 ; Akhmanova and Steinmetz, 2008 ; Lomakin <i>et al.</i> , 2009
Partie C-terminale (motifs doigt de zinc)	CLIP-115 (+TIP)	Lansbergen <i>et al.</i> , 2004
Partie C-terminale (motifs doigt de zinc ; S1384)	LRKK1 (kinase)	Kedashiro <i>et al.</i> , 2015

Annexe I (début)

Domaine d'interaction de CLIP-115	Partenaires protéiques	Références
Partie N-terminale (domaines CAP-Gly)	Tubuline	De Zeeuw <i>et al.</i>, 1997 ; Hoogenraad <i>et al.</i>, 2000
Partie N-terminale (domaines CAP-Gly)	EBs (+TIP)	Bu and Su, 2003 ; Komarova <i>et al.</i>, 2005
Partie N-terminale (domaines CAP-Gly)	CLIP-170 (+TIP)	Lansbergen <i>et al.</i>, 2004
Partie N-terminale (domaines CAP-Gly)	SLAIN2	van der Vaart <i>et al.</i>, 2011
Partie centrale (domaine <i>coiled-coil</i>)	CLASP1/2 (+TIP)	Akhmanova <i>et al.</i>, 2001
Partie centrale (domaine <i>coiled-coil</i>)	BicD	Hoogenraad <i>et al.</i>, 2001
Homologues de CLIP-170	Partenaires protéiques	Références
D-CLIP-190 (<i>D. melanogaster</i>)	Tubuline	Lantz and Miller, 1998
	Actine	Lantz and Miller, 1998 ; Beaven <i>et al.</i>, 2015
	Orbit/Mast (+TIP) (homologues de CLASP1/2)	Máthé <i>et al.</i>, 2003
Bik1 (<i>S. cerevisiae</i>)	Tubuline	Berlin <i>et al.</i>, 1990 ; Boscheron <i>et al.</i>, 2016
	Kip2 (+TIP) (homologue de la kinésine-7)	Carvalho <i>et al.</i>, 2004
	Pac1 (+TIP) (homologue de LIS1)	Sheeman <i>et al.</i>, 2003
Tip1 (<i>S. pombe</i>)	Tubuline	Brunner and Nurse, 2000
	Mal3 (+TIP) (homologue d'EB1)	Busch and Brunner, 2004
	Teal (<i>Tip elongation aberrant protein</i>)	Feierbach <i>et al.</i>, 2004
	Tea2 (+TIP) (homologue de la kinésine-7)	Busch <i>et al.</i>, 2004

Annexe I : Tableau regroupant les partenaires protéiques de CLIP-170, son paralogue CLIP-115 et ses homologues (D-CLIP-190, Bik1 et Tip1). La majorité des partenaires sont des +TIPs (d'après **Akhmanova and Hoogenraad, 2005 ; Galjart, 2010**).

CLIP-170 humain

			78	
hs1	MSMLKP SGLKAPTKI LKPGSTALKTPTAVVAPVEKTIISSEKASSTPSSETQEEFVDDFRVGERVWVNGNKPFGFIQFI	GETQFAPGQWAGI	90	
hs2	MSMLKP SGLKAPTKI LKPGSTALKTPTAVVAPVEKTIISSEKASSTPSSETQEEFVDDFRVGERVWVNGNKPFGFIQFI	GETQFAPGQWAGI	90	
hs3	MSMLKP SGLKAPTKI LKPGSTALKTPTAVVAPVEKTIISSEKASSTPSSETQEEFVDDFRVGERVWVNGNKPFGFIQFI	GETQFAPGQWAGI	90	

	CAP-Gly 1	120		
hs1	VLDEPI GKN DGS VAGVRY FQCEPLKGI FTRPSKLT RRVQAE DEANGLQIT PASRAT SPLCT STASMVSSS PST PSN IPQKPS QPAAKE PS		180	
hs2	VLDEPI GKN DGS VAGVRY FQCEPLKGI FTRPSKLT RRVQAE DEANGLQIT PASRAT SPLCT STASMVSSS PST PSN IPQKPS QPAAKE PS		180	
hs3	VLDEPI GKN DGS VAGVRY FQCEPLKGI FTRPSKLT RRVQAE DEANGLQIT PASRAT SPLCT STASMVSSS PST PSN IPQKPS QPAAKE PS		180	

	S195	232	CAP-Gly 2	
hs1	ATPPISNLT KTASESISNLSSEAGS IKKGERELKIGDRVLVGGTKAGVVRFLGETDFAKGEWC GVELDEPLGKNDGAVAGTRY FQCQPKYG		270	
hs2	ATPPISNLT KTASESISNLSSEAGS IKKGERELKIGDRVLVGGTKAGVVRFLGETDFAKGEWC GVELDEPLGKNDGAVAGTRY FQCQPKYG		270	
hs3	ATPPISNLT KTASESISNLSSEAGS IKKGERELKIGDRVLVGGTKAGVVRFLGETDFAKGEWC GVELDEPLGKNDGAVAGTRY FQCQPKYG		270	

	274	T287	S310/312/314	S320/321
hs1	LFAFVHKVTI KIGFPSITPAKAKANAVRRVMATT SASLKRSHSASLSMS SVA SSVSSR PSRTGLLTETS SRYARKISGTTALQEALKEK		360	
hs2	LFAFVHKVTI KIGFPSITPAKAKANAVRRVMATT SASLKRSHSASLSMS SVA SSVSSR PSRTGLLTETS SRYARKISGTTALQEALKEK		360	
hs3	LFAFVHKVTI KIGFPSITPAKAKANAVRRVMATT SASLKRSHSASLSMS SVA SSVSSR PSRTGLLTETS SRYARKISGTTALQEALKEK		360	

	Coiled Coil			
hs1	QQHIEQLLAERDLERA EVAKATSHVGE IEQELALARDGHDQHVLELEAKMDQLRTMVEAADREKVELLNQLEE EKRKVE DLQFRVEEESI		450	
hs2	QQHIEQLLAERDLERA EVAKATSHVGE IEQELALARDGHDQHVLELEAKMDQLRTMVEAADREKVELLNQLEE EKRKVE DLQFRVEEESI		450	
hs3	QQHIEQLLAERDLERA EVAKATSHVGE IEQELALARDGHDQHVLELEAKMDQLRTMVEAADREKVELLNQLEE EKRKVE DLQFRVEEESI		450	

hs1	TKGDLE QKSQIS EDPENTQT KLEHARI KELEQS LLFEKTKADKLQRE LEDTRVATVSEKSRI MELEKDLALRVQEV AELRRRLESNKPAG		540	
hs2	TKGDLE-----TQTKLEHARI KELEQS LLFEKTKADKLQRE LEDTRVATVSEKSRI MELEKDLALRVQEV AELRRRLESNKPAG		529	
hs3	TKGDLE-----VATVSEKSRI MELEKDLALRVQEV AELRRRLESNKPAG		494	

hs1	DVDMSSL SLLQEI SSLQEKLEVTRT DHQREI TSLKE HFGARE ETHQKE IKALYATE KLS KENESLKS KLE HANKEN SDVIALWKS KLETA		630	
hs2	DVDMSSL SLLQEI SSLQEKLEVTRT DHQREI TSLKE HFGARE ETHQKE IKALYATE KLS KENESLKS KLE HANKEN SDVIALWKS KLETA		619	
hs3	DVDMSSL SLLQEI SSLQEKLEVTRT DHQREI TSLKE HFGARE ETHQKE IKALYATE KLS KENESLKS KLE HANKEN SDVIALWKS KLETA		584	

hs1	IASHQQAME ELKVSF SKGLGT EAEFAELKTQI EKMRLDYQHEI ENLQNQDQSERAAHA KEMEALRAKLMKVI KEKENS LEA IRSKLDKA		720	
hs2	IASHQQAME ELKVSF SKGLGT EAEFAELKTQI EKMRLDYQHEI ENLQNQDQSERAAHA KEMEALRAKLMKVI KEKENS LEA IRSKLDKA		709	
hs3	IASHQQAME ELKVSF SKGLGT EAEFAELKTQI EKMRLDYQHEI ENLQNQDQSERAAHA KEMEALRAKLMKVI KEKENS LEA IRSKLDKA		674	

hs1	EDQHLVEME DTLNKLQEA EIKVKE LEVLQAKCNEQT KV IDNFTS QLKATE EKLDDL DALRKA SSEGKSEMKKLRQQLEAAEKQIKHLEIE		810	
hs2	EDQHLVEME DTLNKLQEA EIKVKE LEVLQAKCNEQT KV IDNFTS QLKATE EKLDDL DALRKA SSEGKSEMKKLRQQLEAAEKQIKHLEIE		799	
hs3	EDQHLVEME DTLNKLQEA EIKVKE LEVLQAKCNEQT KV IDNFTS QLKATE EKLDDL DALRKA SSEGKSEMKKLRQQLEAAEKQIKHLEIE		764	

hs1	KNAESSKAS SITRELQGR ELKLTNLQENLSEVSVQVKTLEKELQ ILKEKFAEA SEEAVSVQRSMQETV NKLHQKKEE QFNMLS SDLEKLE		900	
hs2	KNAESSKAS SITRELQGR ELKLTNLQENLSEVSVQVKTLEKELQ ILKEKFAEA SEEAVSVQRSMQETV NKLHQKKEE QFNMLS SDLEKLE		889	
hs3	KNAESSKAS SITRELQGR ELKLTNLQENLSEVSVQVKTLEKELQ ILKEKFAEA SEEAVSVQRSMQETV NKLHQKKEE QFNMLS SDLEKLE		854	

	920	Pregnenolone	970	
hs1	NLADME AKFREKDEREEQLIKAKE KLENDIAEIMKMSG DNS SQT KMNDE LRLKERDVE ELQ LKLTKANENAS FLQKSI EDMTVKAEQSQ		990	
hs2	NLADME AKFREKDEREEQLIKAKE KLENDIAEIMKMSG DNS SQT KMNDE LRLKERDVE ELQ LKLTKANENAS FLQKSI EDMTVKAEQSQ		979	
hs3	NLADME AKFREKDEREEQLIKAKE KLENDIAEIMKMSG DNS SQT KMNDE LRLKERDVE ELQ LKLTKANENAS FLQKSI EDMTVKAEQSQ		944	

hs1	QEAAKHEE EKKELE RKLSDLEKKMET SHNQCQELKAR YERATS ETKTKEE I LQN LQKTLLDTE DKLKGARE ENSGLLQEELELRKQAD		1080	
hs2	QEAAKHEE EKKELE RKLSDLEKKMET SHNQCQELKAR YERATS ETKTKEE I LQN LQKTLLDTE DKLKGARE ENSGLLQEELELRKQAD		1069	
hs3	QEAAKHEE EKKELE RKLSDLEKKMET SHNQCQELKAR YERATS ETKTKEE I LQN LQKTLLDTE DKLKGARE ENSGLLQEELELRKQAD		1034	

hs1	KAKAAQTAE DAMQIMEQMTKE KTE TLA SLEDTKQTN AKLQNELDTLKENN LKNVEE LNK SKE LLTVENQK MEE FRKEIE TLKQAAAQKSQ		1170	
hs2	KAKAAQTAE DAMQIMEQMTKE KTE TLA SLEDTKQTN AKLQNELDTLKENN LKNVEE LNK SKE LLTVENQK MEE FRKEIE TLKQAAAQKSQ		1159	
hs3	KAKAAQTAE DAMQIMEQMTKE KTE TLA SLEDTKQTN AKLQNELDTLKENN LKNVEE LNK SKE LLTVENQK MEE FRKEIE TLKQAAAQKSQ		1124	

	S1158 ?			
hs1	QLSALQEENVKLAEE LGRSRDEVT SHQKLE EERSVLNNQLLEMKKRE SKF IKDADE EKA SLQKSI SIT SALLTEKDAE LEKLRNEVTVLR		1260	
hs2	QLSALQEENVKLAEE LGRSRDEVT SHQKLE EERSVLNNQLLEMKKRE SKF IKDADE EKA SLQKSI SIT SALLTEKDAE LEKLRNEVTVLR		1249	
hs3	QLSALQEENVKLAEE LGRSRDEVT SHQKLE EERSVLNNQLLEMKKRE SKF IKDADE EKA SLQKSI SIT SALLTEKDAE LEKLRNEVTVLR		1214	

S1318

```

hs1  GENASAKSLHSVVQTLKVDKVKLELKVKNLELQKLNKRQLSSSSGNTDTQADEDERAQESQIDFLNSVIVDLQRKNQDLKMKVEMMSEA 1350
hs2  GENASAKSLHSVVQTLKVDKVKLELKVKNLELQKLNKRQLSSSSGNTDTQADEDERAQESQIDFLNSVIVDLQRKNQDLKMKVEMMSEA 1339
hs3  GENASAKSLHSVVQTLKVDKVKLELKVKNLELQKLNKRQLSSSSGNTDTQADEDERAQESQIDFLNSVIVDLQRKNQDLKMKVEMMSEA 1304
*****
1353                                     1419 Zn finger 1432
hs1  ALNNGDDLNNYDSDQEKQS KKKPRL FCDICDFDLHDTE DCPTQAQMS EDP PHS THHGS RGEERP YCEICEMFGHWA TNCNDD ETF 1438
hs2  ALNNGDDLNNYDSDQEKQS KKKPRL FCDICDFDLHDTE DCPTQAQMS EDP PHS THHGS RGEERP YCEICEMFGHWA TNCNDD ETF 1427
hs3  ALNNGDDLNNYDSDQEKQS KKKPRL FCDICDFDLHDTE DCPTQAQMS EDP PHS THHGS RGEERP YCEICEMFGHWA TNCNDD ETF 1392
*****

```

Annexe II : Alignement des séquences peptidiques des trois isoformes humaines de CLIP-170. Ces isoformes diffèrent au niveau de leur nombre total en acides aminés, l'isoforme courte (hs1, **P30622-2**) possède 1393 acides aminés, l'isoforme restine (hs2, **P30622-1**) présente une insertion de 35 acides aminés (en vert foncé) et l'isoforme longue (hs3, **P30622-3**) a une insertion de 11 acides aminés (en vert clair) en plus de celle de 35 acides aminés (en vert). Les domaines CAP-Gly en N-terminal sont encadrés en bleu, le domaine *coiled-coil* central est encadré en orange, les motifs doigt de zinc sont encadrés en jaune. En plus, le site de liaison de la pregnenolone (P5) est surligné en gris et le motif ETF terminal est surligné en rouge.

CLIP-170/CLIP-115 humain (partie N-terminale)

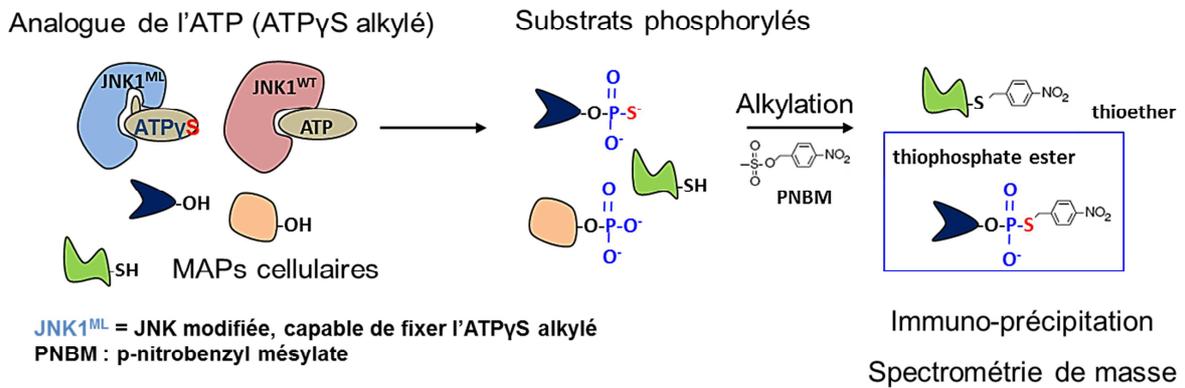
```

clip170 MSMLKPSGLKAPT KILKPGSTALK TET -----AVVAPVEKTISSEKASS TESS----- 48
clip115 --MQKPSGLKPPGRGGKHS SP MGRSTSTGSASSSAAVAAS SKEG SPLHKQSSGSPSS SPAAA 58
      * *****.* : * .* :*. *          **.*. :. : . * ** **
clip170 -----ETQEEFVDDFRVGERVWVNGNKP GFIQFLGETQFAPGQWAGIVLDEPIG 97
clip115 AAPEKPGPKAAEVGDDFLGDFVVG ERVWVNGVKPGVVQYLGETQFAPGQWAGVVLDDPVG 118
      * . :.* :.* ***** **.* :.* :***** :*** :.*
clip170 KNDGSVAGVRYFQCEPLKGI FTRPSKLTRKVQAEDEANGLQT TPASRAT SP LCTSTASMV 157
clip115 KNDGAVGGVRYFECPALQGI FTRPSKLTRQPTAEGSGSDAHSVESLTAQN---LSLHSGT 175
      ***.* *****.* .* :***** : **..... :. : * . * * .
clip170 SS SP STP SNIPQKPSQPAAKEPSAT TP PISNLTKTASESISNLS EAGSIKKGERELKIGDR 217
clip115 AT P PLTSRVIPLRES-----VLNSSVKTGNE SGNLSDSGSVKRGEKDLRLGDR 224
      :.* * . ** : *          ... .* .* ***** :.* :.* :.* :.*
clip170 VLVGGTKAGVVRFLGETDFAKGEWCGVELDE PLGKNDGAVAGTRYFQCQPKYGLFAPVHK 277
clip115 VLVGGTKTGVRVYVGETDFAKGEWCGVELDE PLGKNDGAVAGTRYFQCPPKFGLFAPVHK 284
      ***** :***** :*****
clip170 VTKIGFPST TPAKAKANAVRRVMATTSASLKR SP SASSLSSMSSVASSVSSRPSRTGLLT 337
clip115 VIRIGFPST SPAKAKKTKR--MAMGVSALTH SP SSSSISSVSSVASSVGGRRPSRGLLT 341
      * :***** :***** . ** :.* :.* :.* :.* :.* :.* :.* :.*
clip170 ETSSRYARKISGTTALQEALKEKQOHIEQLLAERDLERA EVAKATSHVGEIEQELALARD 397
clip115 ETSSRYARKISGTTALQEALKEKQOHIEQLLAERDLERA EVAKATSHICEVEKEIALLKA 401
      ***** :***** :***** :

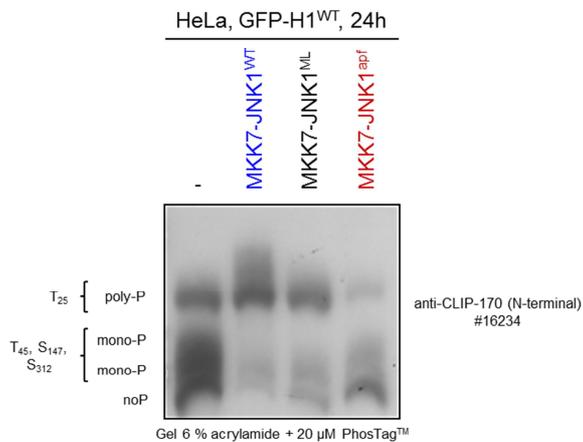
```

Annexe III : Alignement des séquences peptidiques du domaine H1 entre CLIP-170 (**P30622**) et CLIP-115 (**Q9UDT6**). Les sites de phosphorylation SP/TP de JNK (T25, T45 et S147) de CLIP-170 sont surlignés en rouge (cf. publication de la thèse). Ils ne sont pas retrouvés dans la séquence de CLIP-115. Les autres sites SP/TP sont surlignés en jaunes (pour CLIP-170 : T140, T182, S160, T163, T287 et S310 ; pour CLIP-115 : S18, S42, T177, S296, S326).

A



B



Annexe VI : Crible systématique pour identifier d'autres substrats de JNK dans les cellules épithéliales impliqués dans la dynamique des microtubules. (A) Technique du crible mettant en évidence les différentes étapes, phosphorylation des substrats avec l'ATP γ S, alkylation des substrats phosphorylés et formation du groupement thiophosphate ester, immunoprécipitation des substrats et identification de ces derniers par spectrométrie de masse (d'après *Allen et al., 2007*). (B) Western-blot (gel 6 % acrylamide + 20 μM PhosTagTM) sur des extraits de cellules HeLa co-transfectées avec GFP-H1^{WT} et JNK1^{WT}, ou JNK1^{ML} (kinase modifiée au niveau de sa poche de liaison à l'ATP pouvant fixer l'ATP γ S), ou encore JNK1^{apf} (kinase constitutivement non-active). Western-blot hybridé avec l'anticorps anti-CLIP-170 (N-terminal) #16234.

Titre : Régulation de la dynamique des microtubules par la kinase de stress JNK dans les cellules épithéliales : caractérisation de CLIP-170 comme un nouveau substrat.

Mots clés : Microtubules, JNK (*c-Jun NH₂-terminal Kinase*), CLIP-170 (*Cytoplasmic Linker Protein of 170 kDa*), β -tubuline, Sauvetage microtubulaire, Cellules épithéliales

Résumé : Les microtubules sont des éléments dynamiques du cytosquelette qui contrôlent à la fois l'organisation du cytoplasme, la polarité, la migration et la division cellulaire. Notre laboratoire a précédemment montré que la kinase de stress JNK (*c-Jun NH₂-terminal Kinase*) régule la dynamique des microtubules dans les cellules épithéliales de mammifères, en augmentant les vitesses de polymérisation, ainsi que les fréquences de sauvetage (transition vers une phase de re-polymérisation). Alors que certaines protéines neuronales capables de réguler la dynamique des microtubules ont été identifiées comme des substrats de JNK, leurs équivalents dans les cellules épithéliales sont largement méconnus. Dans le but de comprendre comment JNK module la dynamique des microtubules dans les cellules épithéliales de mammifère, nous avons étudié deux substrats potentiels de JNK : la β -tubuline et le facteur de sauvetage CLIP-170. Nous avons bien mis en évidence *in vitro*, une phosphorylation de la β -tubuline par JNK sur une thréonine non-consensus, mais cette phosphorylation n'a pas été retrouvée dans les cellules HeLa, suggérant que la β -tubuline n'est pas un substrat naturel de JNK *in vivo*. Nous avons mis en évidence par ailleurs que CLIP-170 est un nouveau substrat de JNK. Dans les cellules épithéliales, JNK activée phosphoryle trois résidus (Thr25, Thr45 et Ser147) situés dans la partie N-terminale de CLIP-170 de part et d'autre du premier domaine CAP-Gly qui est nécessaire pour l'interaction avec les microtubules. Ces acides aminés présentent des différences aussi bien dans leur phosphorylation basale que dans leurs cinétiques de phosphorylation par JNK sous divers stress. *In vitro*, ces résidus sont directement phosphorylés par JNK, préférentiellement quand le domaine N-terminal de CLIP-170 lie la tubuline. De plus, l'expression de mutants de CLIP-170 phospho-mimétiques et non-phosphorylables a montré que la phosphorylation de chaque site augmente la fréquence des sauvetages microtubulaires. Cette modulation n'est pas corrélée à une augmentation de la capacité de CLIP-170 à former des comètes aux extrémités plus en croissance ou à être retenue aux croisements microtubulaires, qui sont des sites de sauvetage potentiels.

Ce travail a permis de décrire les premières phosphorylations de CLIP-170 qui stimulent sa fonction de sauvetage *in vivo*. Il souligne par ailleurs la complexité des mécanismes de sauvetage, qui demeurent un aspect encore énigmatique de l'instabilité dynamique des microtubules. L'activité de JNK sur CLIP-170 ne permet d'expliquer qu'une partie des effets de la kinase sur la dynamique des microtubules, aussi la recherche d'autres protéines cibles de JNK pouvant réguler notamment leur vitesse de polymérisation, reste à entreprendre.

Title: Microtubule dynamics regulation by the stress kinase JNK in epithelial cells: characterization of CLIP-170 as a new substrate.

Keywords: Microtubules, JNK (*c-Jun NH₂-terminal Kinase*), CLIP-170 (*Cytoplasmic Linker Protein of 170 kDa*), β -tubulin, Microtubule rescue, Epithelial cells

Abstract: Microtubules are dynamic cytoskeleton elements, which control cytoplasm organization, cell polarity, migration and division. Our laboratory has previously shown that the stress kinase JNK (*c-Jun NH₂-terminal Kinase*) regulates microtubule dynamics in mammalian epithelial cells, by increasing their growth rates, and their rescue frequencies (transition towards phases of repolymerization). While several neuronal proteins regulating microtubule dynamics have been identified as JNK substrates, their counterparts in epithelial cells are largely unknown. With the aim to understand how JNK modulates microtubule dynamics in mammalian epithelial cells, we studied two putative substrates of JNK: β -tubulin and the rescue factor CLIP-170. Regarding β -tubulin, using an *in vitro* kinase assay, we found that a non-consensus threonine is actually phosphorylated by JNK, but we were not able to find this phosphorylation in HeLa cells, suggesting that β -tubulin is not a natural JNK substrate. In parallel, we found that CLIP-170 is a new substrate of JNK in epithelial cells. Activated JNK phosphorylates three residues (Thr25, Thr45 and Ser147) located in the N-terminal part of CLIP-170, on each side of the first CAP-Gly domain, which is required for CLIP-170 interaction with microtubules. These residues exhibit differences in their level of basal phosphorylation and their kinetics of phosphorylation by JNK under various stresses. Using an *in vitro* kinase assay, we found that all these residues are directly phosphorylated by JNK, preferentially when the N-terminal domain of CLIP-170 binds tubulin. Furthermore, using phospho-mimetic and non-phosphorylatable CLIP-170 mutants in epithelial cells, we revealed that the phosphorylation of each site increases microtubule rescues. Such modulation operates without increasing CLIP-170 capability to form comets at the microtubule growing plus ends or to accumulate at microtubule crossings, which are potential rescue sites.

This work described the first phosphorylations that enhance CLIP-170 rescue factor function *in vivo*. It also points out to which extent rescue mechanisms are complex and remain an elusive aspect of dynamic instability. JNK-mediated phosphorylation of CLIP-170 only partly explains the kinase effects on microtubule dynamics. Therefore, identifying other JNK targets that may regulate microtubule polymerization rate, remains to be addressed.



