



HAL
open science

Régulation des microtubules par les modifications post-traductionnelles au cours de la migration des astrocytes

Bertille Bance

► **To cite this version:**

Bertille Bance. Régulation des microtubules par les modifications post-traductionnelles au cours de la migration des astrocytes. Biologie cellulaire. Université Pierre et Marie Curie - Paris VI, 2017. Français. NNT : 2017PA066105 . tel-02087296v2

HAL Id: tel-02087296

<https://theses.hal.science/tel-02087296v2>

Submitted on 2 Apr 2019

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.



UNIVERSITÉ PIERRE ET MARIE CURIE

école doctorale Complexité du Vivant

Thèse de doctorat de Biologie Cellulaire

Présentée par Bertille BANCE

**Régulation des microtubules par les
modifications post-traductionnelles au
cours de la migration des astrocytes**

Dirigée par Sandrine ETIENNE-MANNEVILLE

Unité Polarité Cellulaire, Migration et Cancer - Institut Pasteur

Présentée et soutenue publiquement le 31 mars 2017

devant le jury composé de :

Ali BADACHE Rapporteur
Guillaume MONTAGNAC Rapporteur
Bruno GOUD Examineur
Juliette VAN DIJK Examinatrice
Joëlle SOBCHAK-THÉPOT Présidente
Sandrine ETIENNE-MANNEVILLE Directrice de thèse

"La connaissance scientifique possède en quelque sorte des propriétés fractales : nous aurons beau accroître notre savoir, le reste - si infime soit-il - sera toujours aussi infiniment complexe que l'ensemble de départ."
de Isaac Asimov - Moi, Isaac Asimov (1986)

Remerciements

Tout d'abord merci à Sandrine pour m'avoir fait confiance durant cette thèse. Ces 3 années sous ta direction ont été particulièrement enrichissantes. Tout en me laissant une libre et autonome, tu m'as enseigné et guidé durant.

Je souhaite remercier les membres du jury d'avoir accepté d'évaluer le travail que j'ai effectué durant cette thèse. Merci à M. Ali Badache et M. Guillaume Montagnac d'avoir accepté d'être les rapporteurs de ma thèse. Merci à M. Bruno Goud d'avoir accepté d'être examinateur de ma thèse. Je vous remercie aussi pour votre rôle au sein de mon comité de thèse. Votre expertise m'a éclairé sur mon projet. Merci à Mme Juliette Van Dijk d'avoir accepté d'être examinatrice de ma thèse. Nos discussions à Heidelberg sont pour moi de très bon souvenirs. Merci à Joëlle Sobczak-Thepot d'avoir accepté d'être la présidente de mon jury de thèse.

Quelques lignes sur le papier ne sont pas suffisantes pour exprimer le plaisir que j'ai ressenti durant ces 3 années avec vous. L'expertise scientifique et la cohésion du groupe a été un moteur pour moi durant cette thèse. Travailler et apprendre en s'amusant est une chance. Je suis chanceuse d'avoir fait ma thèse dans ces conditions.

Antonio, merci pour ta gentillesse et ton attention durant cette dernière année.

Batiste, ton expertise scientifique, ta bienveillance envers les étudiants en thèse sont atout dans le laboratoire. Être ton co-bureau fut un plaisir,

Cecile, tu as été bien plus qu'une collègue. Tu as veillé sur moi durant cette thèse et je t'en remercie.

Partager ce bureau avec vous deux fut un privilège. Ces moments vont me manquer.

Chiara, nous avons débuté cette thèse ensemble et nous la terminons

ensemble.

Dora, une boule d'énergie et une folie douce, qui as veillé sur moi.

Flora, tu m'as guidé durant le début de ma thèse et m'as manqué le reste de celle-ci.

Franck, je me souviens de quand tu es arrivé dans le laboratoire et depuis tu en es devenu un élément essentiel.

Julien, je te remercie de m'avoir guidé durant la première année et d'avoir partagé avec moi ton expérience et tes connaissances.

Kerren, ta douceur, ta générosité et tes super conseils de boutiques et restaurants vont terriblement me manquer.

Lavinia, l'amicizia tra dottorandi e' fondamentale! Senza di te, senza le nostre pause giornaliera, le birre settimanali ed il tuo "secondo grado" leggendario, questi tre anni sarebbero stati molto piu' lunghi! Non mi allontanero', te lo prometto!

Muguette, merci pour ta gentillesse et ta bienveillance

Yamini, A joyous naturalness, a breathe of fresh air in the laboratory. Your smile, your energy, you spontaneity have enlivened these last months of thesis.

shailaja, welcome in the wonderful world of microtubule acetylation! Thanks for your help and if you need it, be sur I will be there.

Le laboratoire a été une deuxième famille pour moi, et avec cette cohésion et cette bonne ambiance ma thèse a été un véritable moment de plaisir.

Je tiens à remercier Pierre, tu a été un allié durant cette thèse. Merci pour ton soutien, l'intérêt que tu as porté à mon projet et de m'avoir supporté... Tes encouragements, la confiance que tu portes en moi et tes délicieux petits plats m'ont grandement aidé. Cette thèse a aussi été la tienne.

Marie, je suis incroyablement chanceuse de t'avoir à mes cotés. Tu as toujours été là dans les bons comme dans les mauvais moments. Notre "colocation" a été une bénédiction et nos litres de tisane/vin, un vrai carburant.

Je remercie tout ceux qui ont été présents : Jacques pour ta bienveillance, ton cynisme, et nos soirées entre filles ; Camille C, Camille M, Fanny, Ron, Tanguy, Marwan. Et enfin, mes parents ; si j'en suis là c'est grâce à eux.

Résumé

La migration des cellules est nécessaire au cours du développement. Chez l'adulte, elle contribue au renouvellement des tissus, à la cicatrisation et à la circulation des cellules immunitaires. Les cellules cancéreuses acquièrent des capacités de migration qui échappent aux mécanismes normaux de régulation. Elles peuvent ainsi envahir les tissus environnants et, éventuellement, former des métastases.

Les astrocytes représentent une majorité de cellules gliales du système nerveux central. Ils migrent en réponse à des facteurs inflammatoires et interviennent ainsi dans la cicatrisation et la régénération des tissus lésés. Les astrocytes peuvent être à l'origine de tumeurs appelées gliomes qui représentent la majorité des tumeurs cérébrales primaires. Les formes les plus agressives, appelées glioblastomes, sont des tumeurs extrêmement invasives, ce qui les rend particulièrement difficiles à traiter.

Les microtubules jouent un rôle crucial dans la migration des astrocytes et des cellules de gliomes (Etienne-Manneville, 2013a). Au cours de la migration, le réseau de microtubules est totalement réorganisé pour permettre la polarisation de la cellule. Formés par association de dimères d' α et β -tubuline, leur régulation intervient de multiples manières comme par exemple au niveau de leur dynamique de polymérisation à la périphérie de leurs interactions avec les composants cellulaires ou par leurs modifications post-traductionnelles (Etienne-Manneville, 2010). En effet, les dimères de tubulines polymérisées, incluses dans les microtubules, peuvent être, entre autres, détyrosinées, acétylées, mono ou poly-glutamylées, et mono ou poly-glycylées (Janke and Chloë Bulinski, 2011). Durant la migration cellulaire, ces modifications post-traductionnelles peuvent notamment jouer un rôle dans la régulation du trafic intracellulaire.

L'objectif majeur de mon projet de thèse est d'étudier les mécanismes

de régulation des microtubules au cours de la migration des astrocytes normaux et tumoraux, et plus particulièrement le rôle des modifications post-traductionnelles de la tubuline. Je me suis focalisée sur trois principales modifications post-traductionnelles des microtubules durant la migration : la polyglutamylolation, la détyrosination et l'acétylation. En premier lieu, j'ai étudié le rôle potentiel de la polyglutamylolation dans la mise en place de la polarité cellulaire chez les astrocytes. Je n'ai pas observé d'effet de cette modification durant la migration des astrocytes. Je me suis concentrée ensuite sur la détyrosination et l'acétylation, deux modifications généralement observées sur les microtubules "âgés" et stables. J'ai observé que ces deux modifications n'avaient pas le même effet sur la migration des astrocytes, bien qu'elles soient généralement associées aux mêmes fonctions biologiques. En effet l'augmentation de la tyrosination augmente la vitesse de migration des astrocytes tandis que la diminution de l'acétylation diminue leur vitesse de migration. J'ai montré que l'acétylation des microtubules par l'acétyltransférase α TAT1 régule la dynamique des sites d'adhésion à la matrice extracellulaire au cours de la migration astrocytaire. L'absence d' α TAT1 induit un défaut de capture des microtubules à proximité des plaques d'adhérence régulée, entre autres, par la protéine MICAL3. Ce défaut de recrutement de MICAL3 induit une perturbation de l'exocytose localisée au niveau de ces sites d'adhésion.

J'ai montré que la protéine α TAT1 régule la dynamique des plaques d'adhérence en contrôlant la fusion des vésicules Rab6A positives avec la membrane plasmique à proximité des plaques d'adhérence. Le contrôle du trafic membranaire vers les plaques d'adhérence par l'acétylation des microtubules implique MICAL3, protéine nécessaire à l'ancrage des microtubules à la membrane plasmique.

Sommaire

Remerciements	i
Résumé	iii
Sommaire	iv
I Introduction	1
1 La migration cellulaire	5
1.1 Migration individuelle versus migration collective . . .	5
1.1.1 Migration amiboïde versus migration mésoenchy- male	6
1.1.2 Les caractéristiques de la migration collective .	9
1.1.3 Un modèle <i>in vitro</i> de migration collective : la migration astrocytaire	14
1.2 Le cytosquelette dans la migration cellulaire	17
1.2.1 Les filaments d'actine	17
1.2.2 Les microtubules	18
1.2.3 Les filaments intermédiaires	19
1.3 L'établissement et la maintenance d'un axe de polarité avant-arrière durant la migration cellulaire dirigée . . .	20
1.3.1 Définition	20
1.3.2 l'établissement d'un axe noyau-centrosome contri- bution à la migration cellulaire dirigée	21
1.3.3 Mécanisme de l'orientation de l'axe noyau-centrosome	24
1.4 La dynamique de l'adhésion	27
1.4.1 La dynamique des jonctions adhérentes durant la migration collective	27
1.4.2 L'adhésion à la matrice extra-cellulaire	32

2	Les microtubules	45
2.1	Structure et organisation	45
2.1.1	La tubuline, sous-unité des microtubules	45
2.1.2	Structure cylindrique des microtubules	47
2.1.3	Organisation des microtubules dans la cellule	49
2.2	La dynamique des microtubules	50
2.2.1	L'instabilité dynamique des microtubules	50
2.2.2	Régulation de l'instabilité dynamique des microtubules	51
2.3	Régulation de la fonction des microtubules : le "code" tubuline	58
2.3.1	Les isotypes de tubuline	58
2.3.2	Les modifications post-traductionnelles des microtubules	59
3	Le rôle et la régulation des microtubules durant la migration cellulaire	83
3.1	Les microtubules participent à la formation de la protrusion cellulaire	83
3.2	Les microtubules contribuent à la mise en place de la polarité cellulaire durant la migration	91
3.2.1	Le réseau de microtubules est polarisé et asymétrique dans les cellules en migration	91
3.2.2	La régulation polarisée du réseau de microtubules à la périphérie de la cellule	92
3.3	Les microtubules régulent la dynamique de l'adhésion cellulaire à la matrice	94
II	Objectifs	105
	Partie 1 : Etudier le rôle de la polyglutamylation dans la mise en place de la polarité cellulaire	107
	Partie 2 : Caractériser le rôle de la détyrosination et de l'acétylation dans la régulation des microtubules durant la migration astrocytaire	109

Partie 3 : Caractériser le rôle de l'acétylation dans la fonction des microtubules durant la migration astrocytaire	111
Partie 4 : Déterminer le mécanisme moléculaire contribuant à la régulation de la dynamique des plaques d'adhérence par l'acétylation des microtubules	113
III Résultats	115
1 Étude du rôle de la polyglutamylolation dans le contrôle de la polarité cellulaire	117
1.1 Localisation de la (poly)glutamylolation dans les astrocytes normaux en migration	118
1.2 Étude du rôle de la polyglutamylolation dans la polarité des astrocytes	121
1.2.1 Test de polarité	121
1.2.2 L'inhibition de la polyglutamylolation par déplétion d'une glutamylase : TTLL1	122
1.3 Etude du rôle du cil primaire dans la polarité cellulaire	123
1.3.1 Le cil primaire est polarisé durant la migration des astrocytes	123
1.3.2 La déplétion de TTLL1 n'induit pas de défaut de polarité du cil primaire dans les astrocytes en migration	126
1.3.3 La sur-expression de la carboxypeptidase CCP5 n'a pas d'effet sur la polarité du centrosome dans les astrocytes	126
1.3.4 La sur-expression de CCP5 n'a pas d'effet sur la polarité du cil primaire	128
2 Les niveaux d'acétylation et de détyrosination des microtubules régulent la vitesse de migration des astrocytes	131
2.1 L'acétylation et la détyrosination des microtubules durant la migration astrocytaire	131

2.2	Diminution des niveaux d'acétylation et de détyrosination des microtubules en ciblant les enzymes impliquées dans ces modifications	133
2.2.1	La déplétion spécifique de l'acétyl-transférase α TAT1 induit une diminution du niveau d'acétylation des microtubules	133
2.2.2	La sur-expression de la tubuline tyrosine ligase TTL induit une diminution du niveau de détyrosination des microtubules	136
2.3	L'acétylation et la détyrosination des microtubules régulent la vitesse de migration des astrocytes	138
2.3.1	La déplétion spécifique d' α TAT1 induit une diminution de la vitesse de migration des astrocytes	138
2.3.2	La sur-expression de TTL induit une augmentation de la vitesse de migration des astrocytes . .	140
2.4	Les modifications du niveau d'acétylation des microtubules perturbent la vitesse de migration	142
3	L'acétyltransférase αTAT1 (ou l'acétylation) régule la dynamique des plaques d'adhérence	147
3.1	Localisation d' α TAT1 et des microtubules acétylés . . .	147
3.1.1	Les microtubules à proximité des plaques d'adhérence sont acétylés	147
3.1.2	α TAT1 est localisé au niveau des plaques d'adhérence	149
3.2	La déplétion d' α TAT1 affecte la dynamique des plaques d'adhérence	150
3.2.1	La déplétion d' α TAT1 affecte le nombre et la distribution des plaques d'adhérence	150
3.2.2	La déplétion d' α TAT1 affecte la dynamique des plaques d'adhérence	159
3.3	La régulation de la dynamique des plaques d'adhérence par α TAT1 semble être indépendante du niveau d'acétylation des microtubules.	162
3.3.1	La modification du niveau d'acétylation des microtubules n'affecte pas le nombre et la distribution des plaques d'adhérence	162

3.3.2	Sauvetage phénotypique par sur-expression de l'acetyl-transférase α TAT1	168
3.4	L'absence d'APC phénocopie l'absence d' α TAT1	169
3.4.1	APC contrôle l'acétylation des microtubules	169
3.4.2	La déplétion d'APC induit une perturbation de la dynamique des plaques d'adhérence	171
4	l'acétylation des microtubules par αTAT1 régule le trafic membranaire à proximité des plaques d'adhérence.	175
4.1	α TAT1 contrôle la dynamique des plaques d'adhérence en régulant la capture des microtubule par MICAL3	175
4.1.1	MICAL3 et ELK sont recrutés à proximité des plaques d'adhérence durant la migration astrocytaire	175
4.1.2	α TAT1 régule le recrutement de MICAL3 à proximité des plaques d'adhérence	176
4.2	α TAT1 contrôle le trafic vésiculaire dépendant des Rab6A au niveau des plaques d'adhérence	178
IV	Discussion	185
V	Matériels et méthodes	203
	Index	211
	Glossaire	211
	Liste des abréviations, des sigles et des symboles	211
	Table des figures	266

Première partie

Introduction

Introduction

Dans le laboratoire, nous étudions les mécanismes qui régulent la mise en place de la polarité et la migration des astrocytes. Cette migration s'effectue de manière collective. Dans cette introduction, je vais donc détailler, dans un premier temps, les principes de la migration mésenchymale collective. Celle-ci est caractérisée par la présence de contacts intercellulaires médiés principalement par les jonctions adhérentes, et par l'intégration et la coordination de contacts à la matrice extracellulaire. La dynamique de ces sites d'adhésion contribue à la polarité cellulaire et la migration dirigée de la cohorte de cellules. Le cytosquelette, composé des filaments d'actine, des filaments intermédiaires et des microtubules, contribue à la régulation de ces contacts. Les microtubules jouent un rôle essentiel durant la migration astrocytaire. C'est pour cette raison que durant ma thèse j'ai étudié plus particulièrement les mécanismes de régulation de la fonction des microtubules au cours de la migration des astrocytes. Je détaillerai donc dans la suite de l'introduction, la structure et la régulation du réseau de microtubules et son rôle dans la régulation de la migration cellulaire. La compréhension des mécanismes de régulation de la migration cellulaire est essentielle pour déterminer les processus dérégulés lors de l'invasion tumorale.

1

La migration cellulaire

Dans le laboratoire nous utilisons les astrocytes comme modèle cellulaire. Leur migration s'effectue de manière collective et mésenchymale.

1.1 Migration individuelle versus migration collective

La migration cellulaire est la capacité d'une cellule à se déplacer de manière active d'une localisation à une autre. Elle est essentielle chez les organismes pluricellulaires puisqu'elle participe à de nombreux processus physiologiques et pathologiques. Par exemple, lors de la morphogénèse elle contribue à la formation des tissus et organes, mais aussi chez l'adulte durant la cicatrisation, le renouvellement des tissus, la réponse immunitaire et la dissémination des cellules cancéreuses (Christiansen and Rajasekaran, 2006; Friedl et al., 1995; Lecaudey et al., 2008; Vaughan and Trinkaus, 1966; Weijer, 2009).

La migration cellulaire est initiée par la formation d'une protrusion à l'avant de la cellule orientée dans la direction de migration. L'intégration de points focaux, sites d'adhésion au substrat, à l'avant de la cellule induit la génération de forces de contraction et permet la translocation, à l'arrière, du corps cellulaire (Figure 1.1).

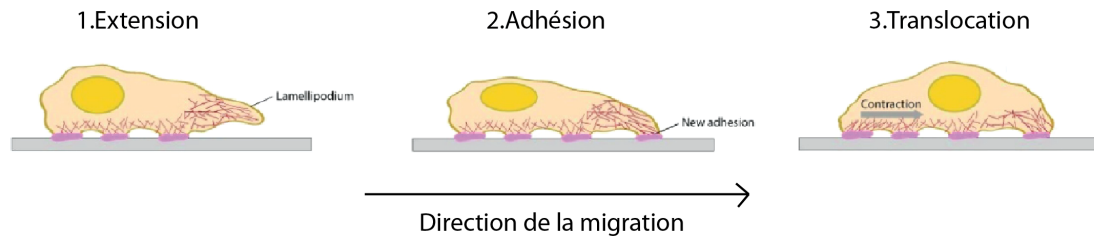


FIGURE 1.1 – Les différentes étapes de la migration cellulaire en deux dimensions.

1. La polymérisation du cytosquelette d'actine et de microtubules permet la formation d'une protrusion à l'avant de la cellule. 2. Des plaques d'adhérence sont formées à l'avant de la cellule. Elles sont liées aux filaments d'actine qui permettent la génération de forces pour faire avancer la cellule. 3. Les forces de contraction au front de migration ainsi que le désassemblage des plaques d'adhérence à l'arrière de la cellule permettent la translocation du corps cellulaire (Ladoux and Nicolas, 2012).

1.1.1 Migration amiboïde versus migration mésenchymale

La migration mésenchymale nécessite l'adhérence des cellules au substrat

Durant la migration collective, plusieurs cellules migrent de manière plus dirigée que les cellules isolées. En effet, bien que les cellules individuelles migrent plus rapidement, elles possèdent une faible persistance de migration, modifiant rapidement et fréquemment leur direction de migration. Dans la migration cellulaire collective, les contacts intercellulaires maintiennent l'intégrité physique du groupe de cellules, mais contribuent aussi à la coordination du mouvement des cellules adjacentes.

Comme pour la migration de cellules individuelles, la migration collective résulte de l'établissement d'un axe de polarité avant-arrière couplé à des réarrangements polarisés du cytosquelette et à la polarisation du trafic membranaire (Figure 1.2).

L'établissement de l'axe de polarité avant-arrière n'est pas seulement structural et morphologique. En effet, la signalisation est, elle aussi polarisée. Elle implique des GTPases de la famille Rho telles que Rac et Cdc42 qui induisent des réarrangements du cytosquelette à l'avant de la cellule. La polymérisation rapide des filaments d'actine à l'avant contribue à la formation de la protrusion membranaire, comme les filopodes et le lamellipode, et induit l'engagement d'adhésions à la

matrice extra-cellulaire via les intégrines (Figure 1.2). A l'arrière de la cellule, Rho induit la contractilité du complexe actomyosine permettant la translocation du corps cellulaire vers l'avant.

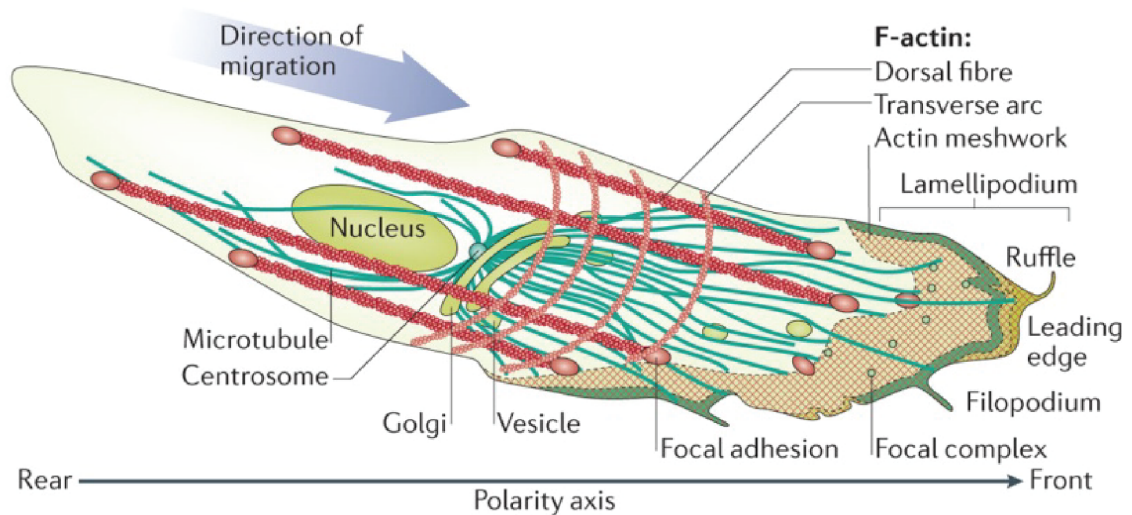


FIGURE 1.2 – Polarisation et migration d'une cellule individuelle

Durant la migration d'une cellule individuelle, l'engagement des intégrines à l'avant avec la matrice extra-cellulaire induit la formation d'une protrusion. L'association entre ces adhésions et les fibres dorsales d'actine vont permettre d'exercer des forces de contraction nécessaires au mouvement de la cellule. Le centrosome est situé à l'avant du noyau et le réseau de microtubules est polarisé afin d'orienter le trafic vésiculaire (Mayor and Etienne-Manneville, 2016).

La migration mésenchymateuse est caractéristique de la migration des fibroblastes. Durant la migration mésenchymateuse, la cellule subit des changements morphologiques et forme une protrusion allongée dans la direction de la migration. La cellule se polarise de façon dépendante des interactions entre les intégrines et la matrice extracellulaire. Afin d'envahir les tissus, les cellules dégradent la matrice via la sécrétion de protéases au front de migration de la cellule. La présence de contacts focaux induit, chez les cellules mésenchymateuses, une migration plus lente (0.1-2m/min) (Zamir et al., 2000).

Le mouvement amiboïde nécessite peu d'adhérence au substrat

Durant ce type de migration, la cellule interagit très peu avec le substrat facilitant le détachement des cellules et donc la rétraction

de l'arrière des cellules. Les cellules sont propulsées vers l'avant grâce à la contractilité du complexe d'actomyosine à l'arrière de la cellule. L'absence ou la quasi absence de contacts focaux induit une migration rapide de ces cellules (Friedl et al., 1998).

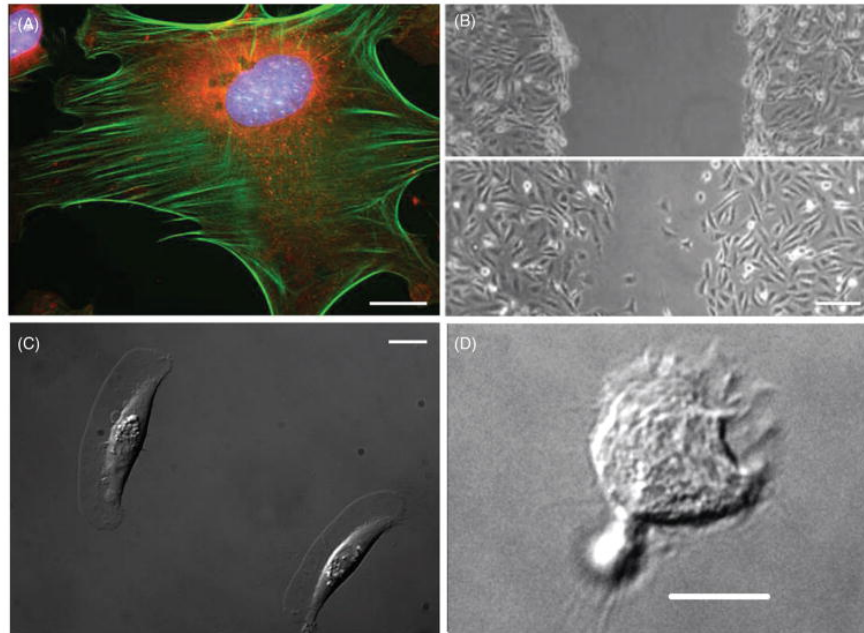


FIGURE 1.3 – **Différents exemples de migration individuelle**

A. Migration d'un fibroblaste (C3H10T1/2). Le noyau est indiqué en bleu, les mitochondries en rouge et l'actine en vert. **B.** Migration de fibroblastes dans un test de blessure. **C.** Migration d'un kératocyte de zebrafish. **D.** Migration d'un leucocyte (HL-60 cell : human promyelocytic leukemia cell). Barre d'échelle pour A, C, and D : 10 μm , pour B : 100 μm . (Trepap et al., 2012)

Contrairement aux fibroblastes, les kératocytes de poissons ou d'amphibiens migrent rapidement (10-15 $\mu\text{m}/\text{min}$) et possèdent une forte persistance de migration durant laquelle la formation de la protrusion, la contraction à l'avant et la rétraction à l'arrière sont étroitement coordonnées et permettent ainsi à la cellule de conserver la même morphologie (Figure 1.3.C) (Bergert et al., 2015).

Autre exemple de migration amiboïde, les leucocytes, communément appelés globules blancs, sont des cellules du système immunitaire, protégeant le corps des diverses infections qu'il peut subir. Ces cellules sont très mobiles et observées à travers tout le corps, aussi bien dans le sang, les tissus et le système lymphatique (Figure 1.3.D).

1.1.2 Les caractéristiques de la migration collective

La migration collective est caractérisée par une vitesse et une direction de migration commune au groupe de cellules. Cette migration dirigée est induite par la présence de contacts intercellulaires médiés principalement par les jonctions adhérentes et la présence de sites d'adhésion à la matrice extracellulaire au front de migration qui permet l'activation de voie de signalisation impliquées dans la polarisation des cellules. Chez les gliomes, la perte des contacts intercellulaires et la localisation anormale des sites d'adhésion dépendant des intégrines induit une vitesse de migration plus importante et une persistance de migration plus faible, ce qui signifie que leur migration n'est plus dirigée (Pégliion and Etienne-Manneville, 2012).

Les cellules "directrices" jouent un rôle de senseur du micro-environnement

Durant la migration collective, les cellules à l'avant du groupe sont appelées cellules "directrices". Ces cellules jouent le rôle senseur du micro-environnement et dictent la direction et la vitesse de migration au groupe de cellules à l'arrière, nommées cellules "suiveuses".

Les cellules directrices sont exposées à de nombreux signaux chimiques externes et jouent un rôle essentiel dans le remodelage de la matrice extra-cellulaire durant la migration. A l'arrière des cellules directrices, les contacts inter-cellulaires inhibent la formation d'un front de migration chez les cellules suiveuses (Figure 1.4).

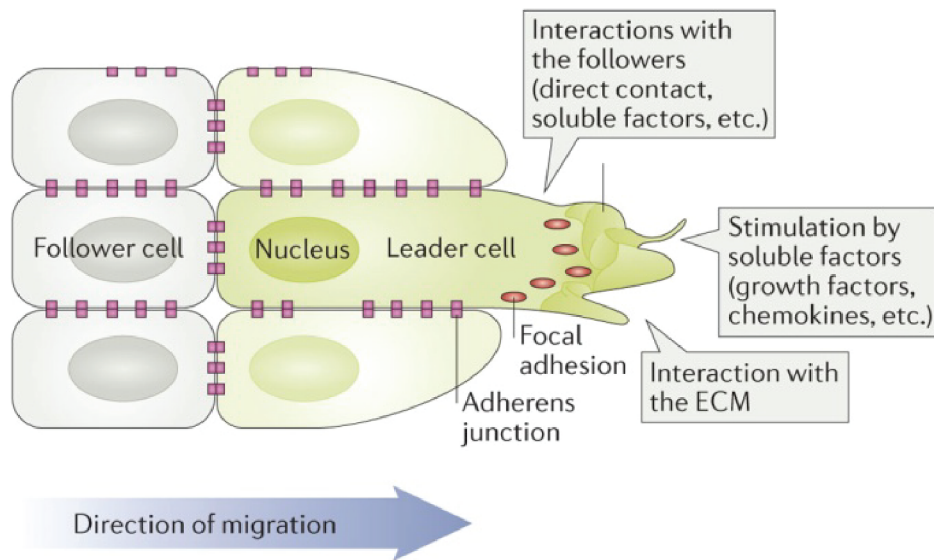


FIGURE 1.4 – **Rôle des cellules directrices durant la migration collective**

Les cellules directrices (leader cell) situées au front de migration régulent la migration de la cohorte de cellules en interagissant directement avec les cellules situées à l'arrière (follower cell) et les cellules directrices adjacentes. La stimulation par des facteurs solubles externes, l'adhésion au substrat et l'adhésion inter-cellulaire permet la polarisation des cellules directrices à l'avant et donc la migration dirigée du groupe de cellule (Mayor and Etienne-Manneville, 2016)

L'interaction des cellules directrices avec la matrice extra-cellulaire L'interaction des cellules avec la matrice extra-cellulaire dépend des intégrines et permet la transduction de signaux mécaniques et chimiques. En effet, en réponse à la composition et à la rigidité du substrat, les intégrines activent des voies de signalisation intracellulaires spécifiques (Boettiger, 2012; Dabiri et al., 2012). *In vitro*, lors d'une migration collective, de nouvelles interactions avec la matrice extra-cellulaire sont induites au front de migration des cellules. Ces interactions induisent l'activation de voies de signalisation permettant des réarrangements du cytosquelette ainsi qu'une polarisation structurale conférant aux cellules directrices leurs caractéristiques (Etienne-Manneville and Hall, 2001).

L'engagement des intégrines avec la matrice extra-cellulaire induit un recrutement et une activation de Cdc42 et/ou Rac via divers adaptateurs (Osmani et al., 2010, 2006; Lawson and Burridge, 2014).

L'activation de ces GTPases promeut l'extension de la protrusion à l'avant ainsi que la polarisation du réseau de microtubules et du trafic vésiculaire qui lui est associé (Etienne-Manneville, 2013b).

Les cellules directrices sont stimulées par des facteurs moléculaires extra-cellulaires *In vivo*, la migration collective est généralement activée par l'intermédiaire de facteurs solubles tels que des chimiokines ou des facteurs de croissance. Les cellules directrices jouent un rôle essentiel dans la perception de facteurs chimiques environnementaux afin d'induire la migration du groupe de cellules selon un gradient chimique. Cette réaction est appelé chimiotaxisme (Haas and Gilmour, 2006).

Ces facteurs chimiques contribuent au mouvement collectif des cellules de deux manières. La première met en jeu une signalisation via des récepteurs aux facteurs de croissance et les chimiokines qui permettent la formation et la polarisation de la protrusion. La majorité des facteurs solubles active Cdc42 et Rac via une signalisation dépendant des phospho-inositides, afin d'induire la polymérisation de l'actine (Barber and Welch, 2006; Kölsch et al., 2008). Dans le cas de la migration de cellules individuelles, une PI3K (phospho-inositide 3-kinase) est recrutée et activée induisant une boucle de retrocontrôle positif de Rac, ce qui contribue par la suite à un réarrangement du cytosquelette d'actine et la formation de la protrusion membranaire.

Afin de contrôler le mouvement collectif des cellules, les facteurs moléculaires externes peuvent aussi induire l'expression spécifique de certains gènes permettant de définir les caractéristiques des cellules directrices (Mayor and Etienne-Manneville, 2016).

Les cellules directrices interagissent entre elles via les contacts intercellulaires Lorsque un groupe de cellules migre collectivement, les cellules directrices sont liées les unes aux autres par l'intermédiaire de jonctions, principalement des jonctions adhérentes, dont les principaux composants sont les cadhérines. Elles interagissent avec les réseaux d'actine et de microtubules via les caténines p120, α et β (Etienne-Manneville, 2011, 2012). Les jonctions adhérentes, via leur interaction avec le cytosquelette d'actine, sont essentielles pour maintenir l'intégrité du tissu et guider la cohorte de cellules en migration. Une perturbation de la

fonction des cadhérines affecte fortement la dynamique migratoire du groupe de cellules (Bazellères et al., 2015).

Les jonctions adhérentes formées par les cadhérines sont aussi impliquées dans la chimiotaxie de la cellule, ce qui suggère que ces interactions entre les cellules sont importantes dans la perception et l'interprétation des signaux chimiques extérieurs (Theveneau and Mayor, 2012).

De nombreuses études ont démontré la relation antagoniste qui existe entre les jonctions adhérentes et les adhésions à la matrice extracellulaire (Dupin et al., 2009; Borghi et al., 2010; Burute and They, 2012). La formation de contacts via les cadhérines est nécessaire afin de polariser correctement les cellules, pour diriger le mouvement collectif (Etienne-Manneville, 2012). Dans le laboratoire, nous avons montré qu'en l'absence de jonction adhérente, les intégrines sont recrutées au niveau de la matrice extracellulaire à la périphérie de la cellule (Camand et al., 2012) (Figure 1.5.a). Cela induit la formation de protrusions membranaires orientées dans diverses directions et une diminution de la persistance de migration (Camand et al., 2012). Dans le cas de la migration collective, les contacts inter-cellulaires contribuent à la polarisation de la cellule en limitant l'engagement des intégrines au front de migration (Figure 1.5.a).

Le maintien et la dynamique des contacts inter-cellulaires sont essentiels pour préserver la cohésion des cellules directrices et du groupe de cellules. Des études précédentes dans le laboratoire ont montré que durant la migration, les jonctions adhérentes sont soumises à un flux rétrograde du complexe d'acto-myosine (Peglion et al., 2014) (Figure 1.5.b). A l'arrière de la cellule, les jonctions se dissocient et sont internalisées pour être ensuite recyclées à l'avant de la cellule afin de former de nouveaux contacts (Peglion et al., 2014). Cette dynamique permet une grande plasticité des contacts inter-cellulaires entre les cellules directrices tout en maintenant une force mécanique via leur association avec les câbles d'actine (Figure 1.5.c).

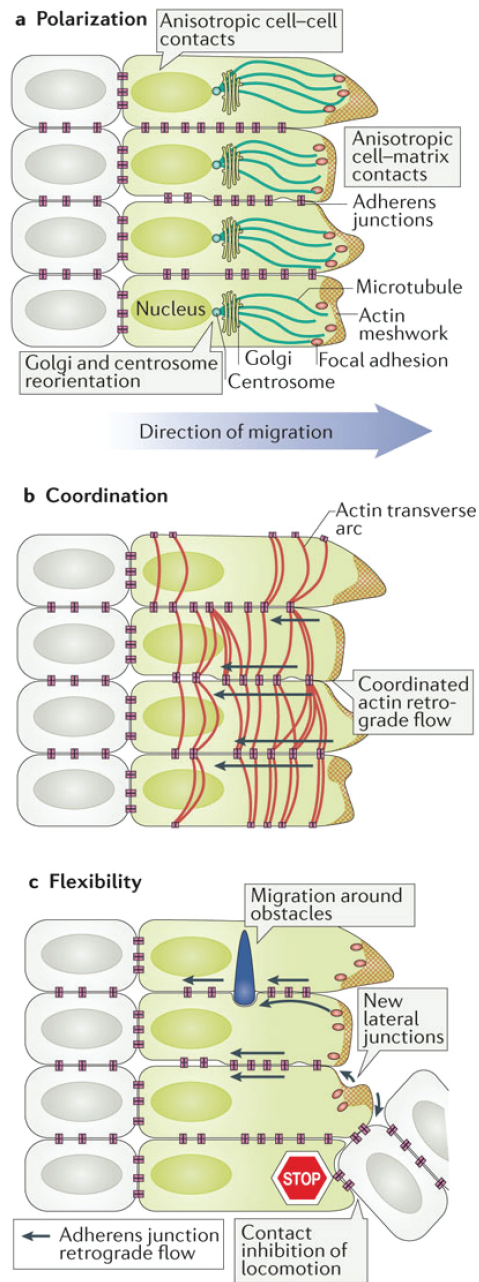


FIGURE 1.5 – Rôle et dynamique des jonctions adhérentes durant la migration collective

a. Les jonctions adhérentes participent à la migration dirigée des cellules. La distribution latérale des jonctions adhérentes limite celle des adhésions à la matrice extra-cellulaire à l'avant. La signalisation induit par l'activation des intégrines est polarisée et participe à l'orientation du cytosquelette, du centrosome et de l'appareil de Golgi dans la direction de la migration. **b.** Les jonctions adhérentes sont associées aux câbles d'actine. Le flux rétrograde des fibres transverses d'actine associées aux jonctions permet de coordonner la dynamique du réseau d'actine entre les cellules adjacentes. **c.** Le flux rétrograde d'actine induit un réarrangement constant des contacts inter-cellulaires. A l'arrière de la cellule, les jonctions se dissocient et sont recyclées afin de redistribuer les cadhérines à l'avant de la cellule et de former de nouveaux contacts. (Mayor and Etienne-Manneville, 2016)

1.1.3 Un modèle *in vitro* de migration collective : la migration astrocytaire

Les astrocytes

Les astrocytes sont des cellules gliales du système nerveux central. Ils assurent un grand nombre de fonctions essentielles pour le développement, la survie et le fonctionnement des neurones.

Les astrocytes jouent un rôle important lors du développement des matières grise et blanche. En effet, les liens créés par les astrocytes guident la migration des axones en développement (Powell and Geller, 1999) et participent aussi à la formation des synapses (Christopherson et al., 2005). Les astrocytes régulent le flux sanguin local de part leur multiples contacts avec le système circulatoire. Ils participent aussi au maintien du pH et de l'homéostasie de l'espace inter-synaptique essentiels pour la transmission de l'information entre les neurones.

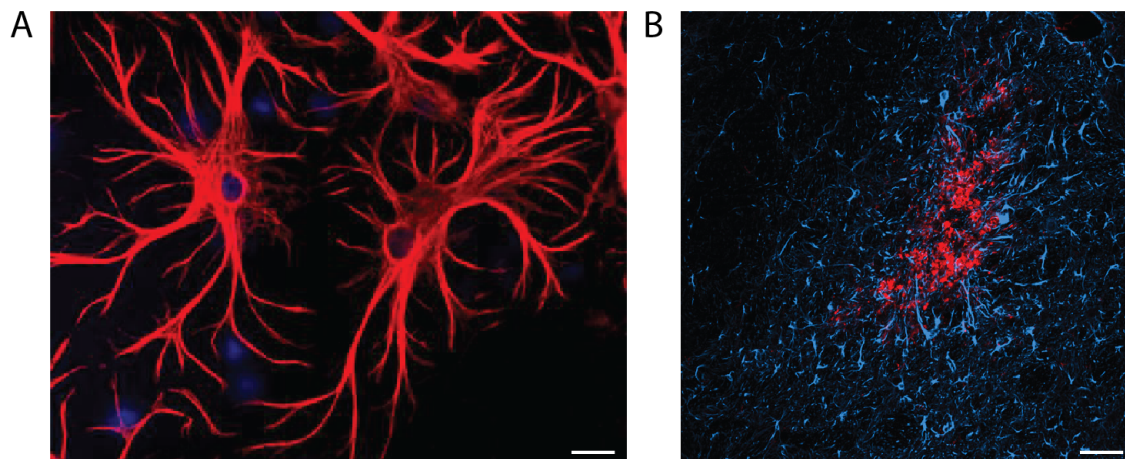


FIGURE 1.6 – Les astrocytes, des cellules gliales

A. En conditions non pathologiques, les astrocytes ont une forme étoilée. Ils peuvent être visualisés avec un marquage de la GFAP (glial fibrillary acidic protein) en rouge. Barre d'échelle : $2\mu\text{m}$. B. Dans le cas de l'astrogliosis, les astrocytes s'activent (en bleu) pour répondre à une réaction inflammatoire (en rouge, la microglie) (image provenant du laboratoire de Maiken Nedergaard, University of Rochester Medical center). Barre d'échelle : $10\mu\text{m}$

Dans des conditions physiologiques normales, les astrocytes ont une forme étoilée (Figure 1.6.A). Mais en cas de lésion du système nerveux central, comme une infection, une ischémie ou une maladie neurodégénérative, les astrocytes subissent un grand nombre de modifications

structurales, moléculaires et génétiques qui suit un processus nommé gliose réactive. Les astrocytes se polarisent et migrent en direction du site inflammatoire afin de cicatriser le tissu lésé (Figure 1.6.B).

Les gliomes, cellules cancéreuses dérivées des astrocytes

Les gliomes sont les tumeurs cérébrales les plus fréquentes chez l'adulte (2/3 des cas) et la deuxième cause de cancer chez l'enfant (Boyle et al., 2008). Elles dérivent de cellules gliales et en particulier d'astrocytes. Les gliomes de grade IV, aussi appelés glioblastomes, sont les plus agressifs et leur pronostic vital est faible. Cela est dû, pour une grande part, à la nature particulièrement invasive de ces tumeurs. La migration des cellules tumorales dans les tissus cérébraux avoisinants diminue l'efficacité de l'excision chirurgicale. La récurrence de la tumeur est quasiment inévitable et 90% des patients développent de nouvelles lésions au niveau du site d'origine de la tumeur (Lee et al., 1999) ou à un site distant dans le cerveau (Krista A. van Nifterik, Paula H. M. Elkhuisen, Rob J. van Andel, Lukas J. A. Stalpers, Sieger Leenstra, M. Vincent M. Lafleur, W. Peter Vandertop, Ben J. Slotman, Theo J. M. Hulsebos and Sminia, 2006) . De plus, les traitements traditionnels et récents ont un impact limité sur le pronostic vital. Parfois, certains traitements semblent même augmenter le potentiel invasif des glioblastomes (Ueno et al., 2015) (Bae et al., 2011). La nature invasive de ces tumeurs et la résistance au traitement de radiothérapie et chimiothérapie restent encore une cause importante de mortalité. La combinaison récente de certains traitements ont permis l'amélioration du pronostic. Cependant la plupart des patients succombent toujours de leur maladie, le pronostic vital médian étant de 15 mois et seulement 3% des patients survivent au-delà de 3 ans (Boyle et al., 2008).

Il est essentiel d'étudier les mécanismes de régulation de la migration des astrocytes normaux afin d'identifier et comprendre les perturbations observées lors de ces processus invasifs.

Le migration astrocytaire *in vitro*

Durant la gliose réactive, les astrocytes se polarisent et migrent en direction du site inflammatoire afin de cicatriser le tissu lésé (Figure

1.7.A). Ce processus peut être reproduit *in vitro* en effectuant un test de blessure. Les astrocytes sont cultivés sur une boîte de pétri jusqu'à obtention d'une monocouche cellulaire. Suite à une rayure de la monocouche, les astrocytes se polarisent et migrent perpendiculairement à la blessure (Figure 1.7.B). Ils forment une longue protrusion d'environ μm orientée dans la direction de la migration. Le noyau est situé à l'arrière du corps cellulaire et le centrosome positionnée à l'avant du noyau. Ce test permet d'étudier les mécanismes cellulaires et moléculaires impliqués dans la polarisation et la migration astrocytaire (revues sandrine).

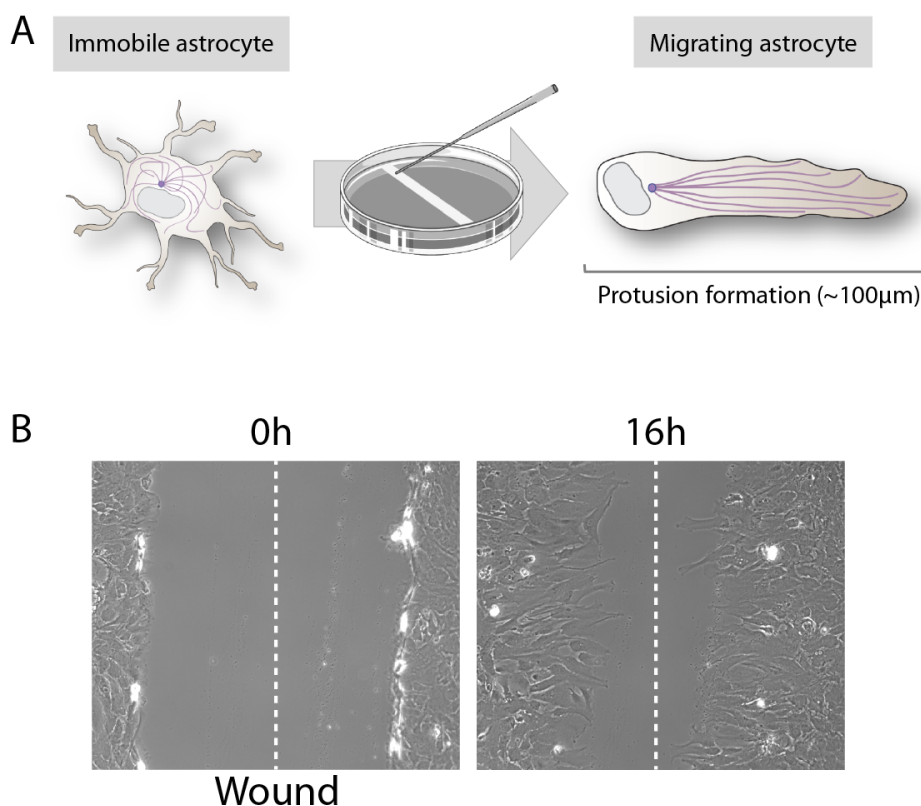


FIGURE 1.7 – Le modèle de migration astrocytaire *in vitro*

A. En culture, les astrocytes ne présentent pas de polarité évidente. Suite à une rayure de la monocouche, les astrocytes se polarisent et migrent perpendiculairement à la blessure. B. Observation en contraste de phase d'astrocytes primaires de rat en migration lors d'un test de blessure *in vitro*. Barre d'échelle : $50\mu\text{m}$

Dans le laboratoire, nous utilisons ce test de blessure *in vitro*, qui est un excellent modèle pour étudier les mécanismes de régulation de la polarité et la migration cellulaire. Durant ma thèse j'ai utilisé

ce modèle pour étudier la régulation des microtubules au cours de la migration astrocytaire.

1.2 Le cytosquelette dans la migration cellulaire

Le cytosquelette est un réseau de fibres protéiques nécessaire à de nombreuses fonctions cellulaires telles que le maintien de la forme de la cellule, la migration cellulaire et la mitose. Il forme une structure complexe et hautement dynamique composée de trois éléments majeurs : les filaments d'actine, les microtubules et les filaments intermédiaires.

1.2.1 Les filaments d'actine

Un filament d'actine F est issu de la polymérisation de plusieurs sous-unités d'actine globulaire G, organisées en double brin hélicoïdal (Holmes et al., 1990).

Il possède un diamètre d'environ 7nm et sa longueur de persistance, propriété mécanique permettant de caractériser la rigidité d'un polymère, est d'environ $17\mu\text{m}$ (Kainulainen et al., 2002). Le filament d'actine est une structure polarisée possédant une extrémité positive "plus", appelée aussi bout barbé, et une extrémité négative "moins", appelée aussi bout pointu (Figure 1.8).

Le réseau d'actine participe à de nombreux processus cellulaires comme la contraction musculaire, la migration cellulaire, la division cellulaire, le transport de vésicules et d'organelles, ainsi que l'établissement et le maintien des jonctions cellulaires et de la forme de la cellule.

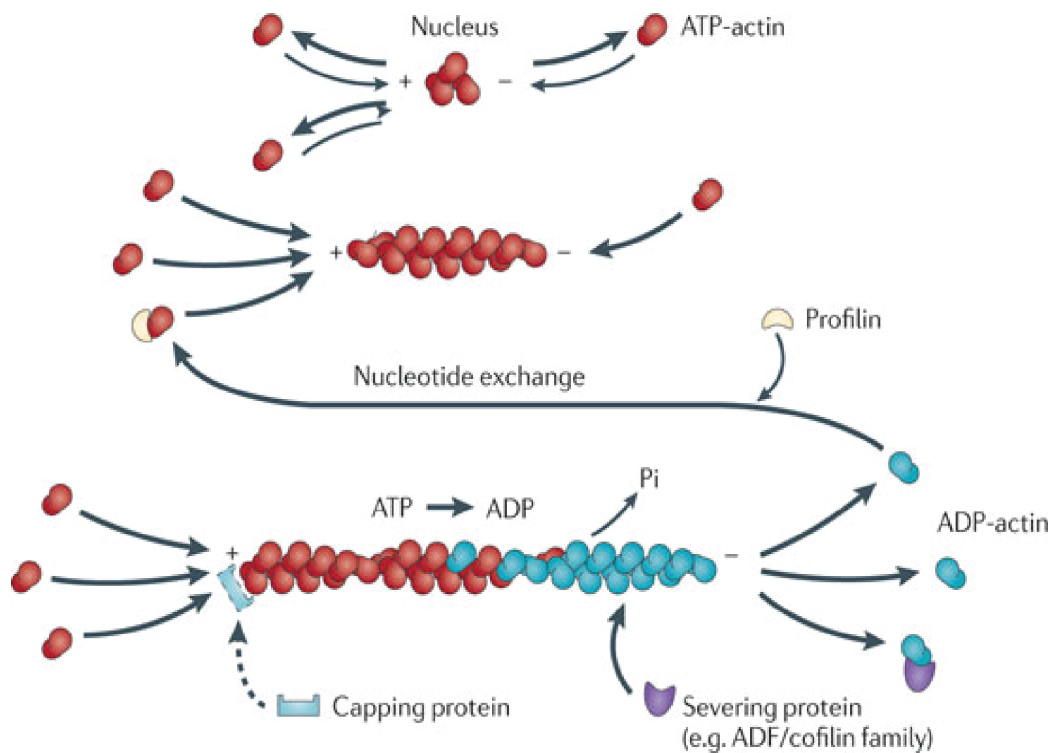


FIGURE 1.8 – **La dynamique des filaments d'actine**

Le filament d'actine croît lorsque l'actine G liée à l'ATP s'associe avec le filament. Dans des conditions physiologiques, l'actine G s'associe plus facilement avec l'extrémité "+" du filament et plus difficilement à l'extrémité "-". Cependant il est possible de croître par les deux extrémités. La polymérisation spontanée des filaments d'actine est limitée par la cinétique de formation des oligomères d'actine (indiquée par les flèches fines et épaisses). Par la suite, l'association des monomère au filament s'effectue plus rapidement à l'extrémité "+" qu'à l'extrémité "-". L'hydrolyse spontanée de l'ATP induit une destabilisation du filament et favorise sa dépolymérisation par l'action de protéines de la famille des cofilines. La profiline induit un achange de nucléotide sur 'actine G liée à l'ADP dissociée du filament (Nürnberg et al., 2011).

1.2.2 Les microtubules

Les microtubules sont l'un des éléments du cytosquelette les plus répandus dans les cellules eucaryotes. Ils sont essentiels à de nombreuses fonctions cellulaires comme la division cellulaire, la migration cellulaire et le transport intracellulaire. Ils forment des tubes creux polarisés d'un diamètre de 25nm qui s'assemblent et se désassemblent depuis leurs extrémités. Leur structure, leur dynamique et leur régulation seront développées dans le chapitre suivant (Chapitre 2).

1.2.3 Les filaments intermédiaires

Contrairement aux filaments d'actine et aux microtubules, les filaments intermédiaires ne possèdent pas de polarité intrinsèque (cf. figure). Ils sont formés de protéines fibrillaires assemblées de façon hélicoïdale d'un diamètre d'environ 10nm (Figure 1.9.A). Il existe environ 70 gènes codant pour différents types de protéines de filaments intermédiaires. Dans les astrocytes, on trouve majoritairement la nestine, la vimentine, la GFAP et la synemine qui sont cytoplasmiques, ainsi que la lamine, qui est nucléaire (Figure 1.9.B).

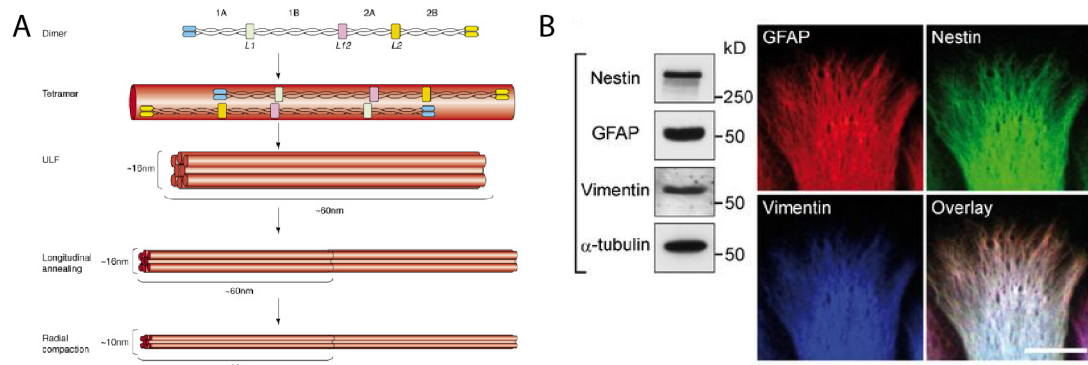


FIGURE 1.9 – La dynamique d'assemblage des filaments intermédiaires

A. l'assemblage des filaments intermédiaires débute par la formation de dimères parallèles. Les dimères s'associent latéralement de manière anti-parallèle pour former des protofilaments. l'association de 8 protofilaments compose l'ULF, l'unité structurale des filaments intermédiaires, qui après compaction forme un filament mature de 10nm de diamètre (Godsel et al., 2008). **B.** Les différents types de filaments intermédiaires présents dans les astrocytes. à gauche, le niveau d'expression des protéines. à droite, une immunofluorescence des filaments intermédiaires (Sakamoto et al., 2013).

Les filaments d'actine et les microtubules sont des structures polarisées qui présentent une dynamique de polymérisation hors équilibre très rapide, de l'ordre de la seconde à la minute (Desai and Mitchison, 1997) et un temps de renouvellement du réseau de l'ordre des minutes, tandis que les filaments intermédiaires sont des structures apolaires possédant un temps de polymérisation de l'ordre de quelques minutes et le renouvellement de son réseau de l'ordre de plusieurs heures (Nöding et al., 2014).

1.3 L'établissement et la maintenance d'un axe de polarité avant-arrière durant la migration cellulaire dirigée

1.3.1 Définition

En réponse aux signaux environnementaux, les cellules animales acquièrent et maintiennent une forme asymétrique. Cette propriété, appelée polarité cellulaire, est fondamentale dans certains processus biologiques tels que la formation des tissus durant le développement. La polarité cellulaire joue aussi un rôle essentiel dans le transport intracellulaire, la division et la différenciation cellulaire, ainsi que dans la directionnalité de la migration (Figure 1.10).

La polarité cellulaire correspond à l'organisation morphologique structurale et fonctionnelle des cellules le long d'un axe de polarité. L'axe de polarité avant-arrière des cellules en migration est, entre autre, défini par une organisation spatiale et temporelle du cytosquelette et des structures associées à l'adhésion.

La polarisation avant-arrière de la cellule est un processus mis en place durant la migration individuelle et collective.

Durant la migration cellulaire, la cellule se polarise et forme un front de migration caractérisé par l'assemblage du cytosquelette qui induit la formation d'une protrusion orientée dans la direction de la migration. Au front de migration, le lamellipode est une zone riche en actine contribuant à la formation de nouveaux contacts avec la matrice extracellulaire et induisant la polymérisation de l'actine et donc de la protrusion (Gupton and Waterman-Storer, 2006). A l'arrière du lamellipode, l'ancrage des fibres d'actomyosine aux plaques d'adhérence matures permet la formation de fibres de stress longitudinales responsables des forces de traction. A l'arrière de la cellule, le désassemblage des plaques d'adhérence induit la translocation du corps cellulaire.

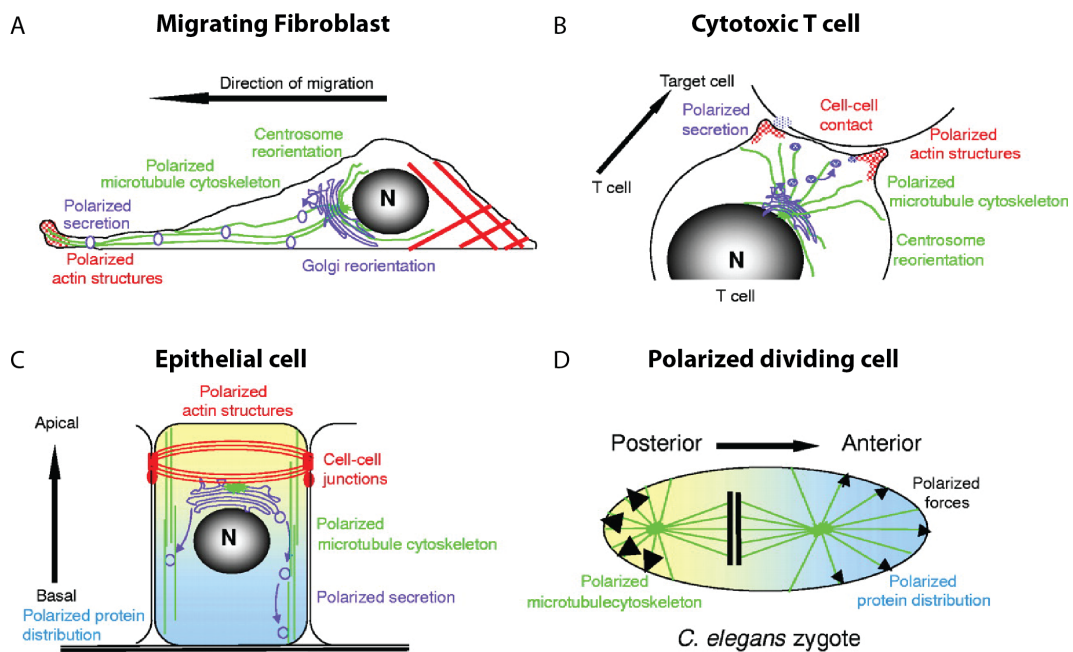


FIGURE 1.10 – Quelques exemples de polarité cellulaire *in vivo*

A. Chez les fibroblastes en migration, le cytosquelette d'actine contribue à la formation de la protrusion dans la direction de la migration. Le réseau de microtubules associé au centrosome et à l'appareil de Golgi s'oriente devant le noyau. **B.** Lorsqu'elle rentre en contact avec la cellule ciblée, la cellule cytotoxique présente une organisation polarisée lui permettant d'établir des contacts stables avec l'autre cellule. Le réseau de microtubule et les voies de sécrétion associées sont orientée dans la direction de ce contact. **C.** Les cellules épithéliales différenciées présentent une polarité apico-basale caractérisée par une distribution spatiale des protéines de part et d'autre les jonctions serrées. **D.** Dans les cellules se divisant de manière asymétrique, comme par exemple le zygote de *C. elegans*, le réseau de microtubules est polarisé et des forces asymétriques sont générées de part et d'autre de chaque pôle de l'embryon. Cela induit un positionnement asymétrique du fuseau mitotique qui contribue à la formation de cellules filles aux tailles différentes. (Etienne-Manneville, 2004c)

1.3.2 l'établissement d'un axe noyau-centrosome contribution à la migration cellulaire dirigée

L'axe noyau-centrosome et l'axe avant-arrière de la cellule sont généralement alignés durant la migration. L'orientation du centrosome à l'avant du noyau, dans la direction de migration, est commune à de nombreux types cellulaires migrant en deux dimensions, comme par exemple dans les astrocytes (Schliwa et al., 1999) et en trois dimensions comme les neurones (Higginbotham and Gleeson, 2007) (Figure 1.11).

1.3 L'établissement et la maintenance d'un axe de polarité avant-arrière durant la migration cellulaire dirigée

Le positionnement correct du centrosome semble contribuer à la persistance de la migration dirigée (Etienne-Manneville, 2013a).

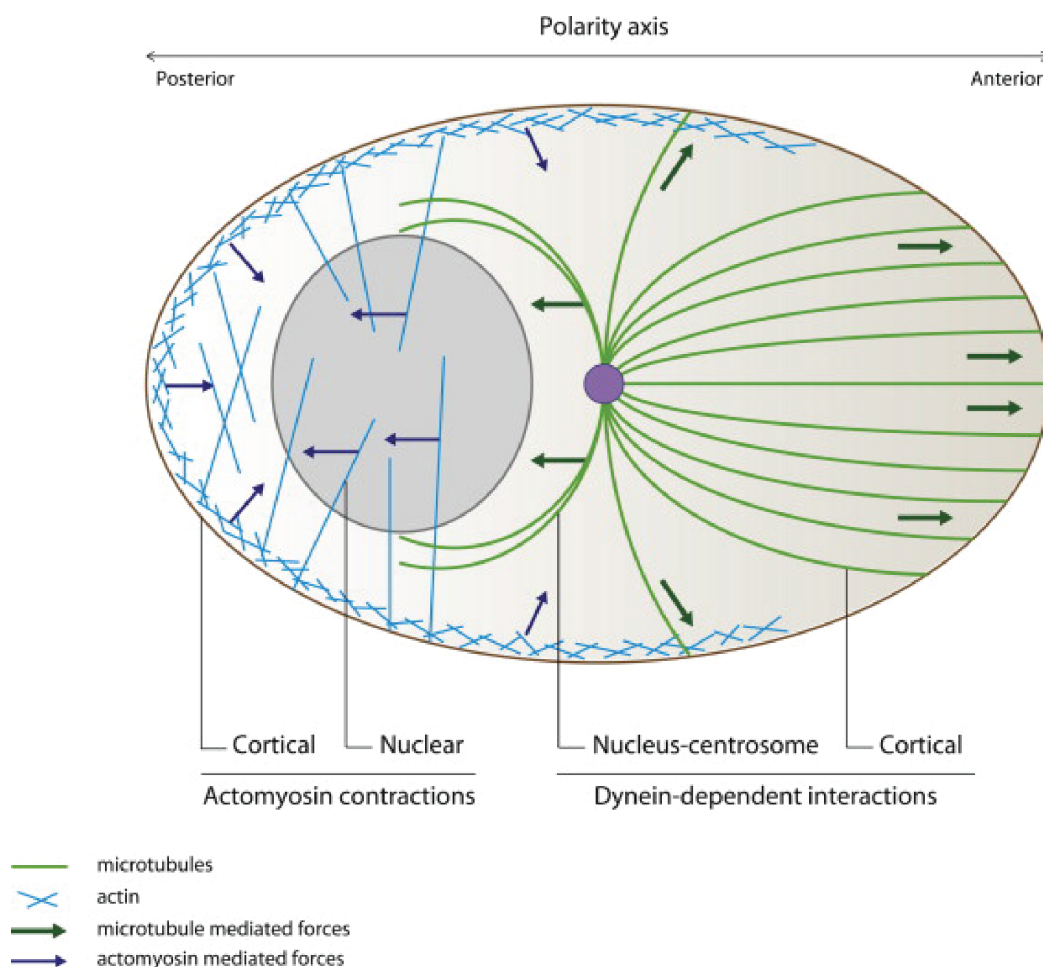


FIGURE 1.11 – L'orientation de l'axe noyau-centrosome dans les cellules en migration

L'orientation de l'axe noyau-centrosome dépend des forces générées par l'actine et les microtubules. Le centrosome (en violet) est connecté au réseau de microtubule (en vert) qui exerce des forces via la dynéine. Le réseau d'acto-myosine (bleu) génère des forces de contraction sur le noyau. (Elric and Etienne-Manneville, 2014)

Dans le laboratoire, nous étudions les mécanismes régulant la mise en place de la polarité cellulaire. L'orientation du centrosome à l'avant du noyau est impliquée dans la migration cellulaire car elle contribue à la polymérisation du réseau de microtubules à l'avant et au positionnement des organelles dans la direction de la migration (Li and Gundersen, 2008; Sütterlin and Colanzi, 2010; Vinogradova et al., 2009) (Figure 1.12).

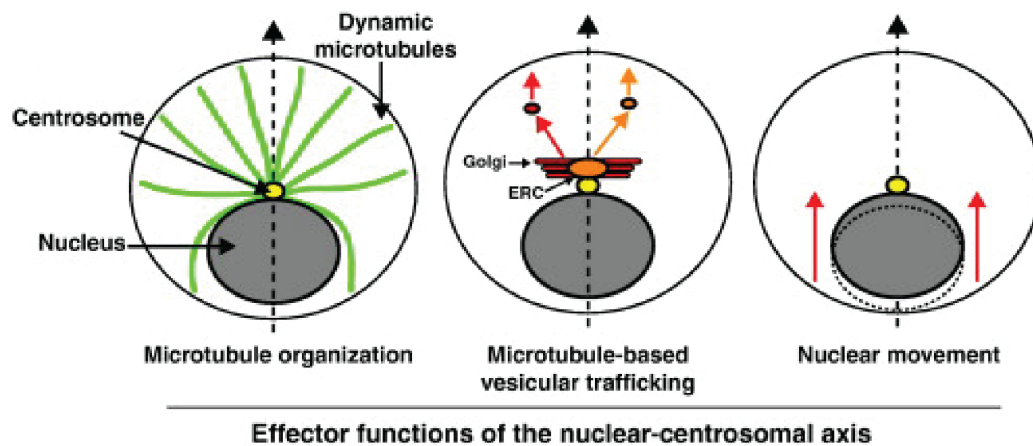


FIGURE 1.12 – Les fonctions associées à l’orientation de l’axe noyau-centrosome

L’orientation du centrosome à l’avant contribue à de nombreuses fonctions essentielles durant la migration cellulaire comme la polymérisation du réseau de microtubules à l’avant de la cellule, le trafic polarisé dépendant des microtubules et le mouvement du noyau. ERC = perinuclear endocytic recycling compartment (Luxton and Gunderson, 2011)

La polarité avant-arrière contribue à la polarisation du réseau de microtubules dans la direction de migration

Le centrosome est le siège de la nucléation des microtubules (Bartolini and Gunderson, 2006). L’extrémité négative des microtubules est généralement, mais pas seulement, ancrée au centrosome (Jiang et al., 2014; Wu et al., 2016), et l’instabilité dynamique du réseau permet à l’extrémité positive de s’étendre radialement afin d’explorer le cytoplasme (Mitchison and Kirschner, 1984).

La dynamique des microtubules en direction du sens de migration de la cellule contribue à la dynamique des plaques d’adhérence (Ezratty et al., 2005; Kaverina et al., 1999; Ezratty et al., 2009), à la régulation de la voie de signalisation médiée par les GTPases Rho et Rac (Waterman-Storer et al., 1999a; Krendel et al., 2002), à la polarisation du trafic vésiculaire et le positionnement des organelles (Figure 1.12).

La réorientation du centrosome permet la polarisation du trafic vésiculaire dépendant des microtubules

L'orientation du centrosome à l'avant du noyau permet l'orientation de deux organelles essentiels au trafic polarisé effectué via par le réseau de microtubules : l'appareil de Golgi et le compartiment de recyclage endocytyque péri-nucléaire (Figure 1.12). Ces deux organelles sont maintenues à proximité du centrosome par la dyneine (Sütterlin and Colanzi, 2010; Driskell et al., 2007). Le trafic des cargos provenant de ces deux organelles est polarisé en direction du front de migration via les microtubules (Schmoranzner and Simon, 2003; Schmoranzner, 2003). Le complexe de protéines associé à l'exocytose est aussi localisé au front de migration et contribue à la migration de nombreux types cellulaires (Rossé et al., 2006; Guo et al., 2001) .

Le trafic polarisé a un rôle important durant la migration cellulaire. Par exemple, dans les cellules de bordure chez la drosophile, le recyclage polarisé des récepteurs kinases RTKs est important pour leur migration dirigée (Assaker et al., 2010). Le recyclage polarisé des intégrines joue aussi un rôle crucial durant la migration (Caswell et al., 2009a).

Le trafic de cargos en provenance de l'appareil de Golgi semble aussi contribuer à la migration. En effet l'inhibition de la protéine kinase D (PKD), régulatrice du trafic en provenance de l'appareil de Golgi, affecte la migration des fibroblastes (Prigozhina and Waterman-Storer, 2004).

1.3.3 Mécanisme de l'orientation de l'axe noyau-centrosome

La signalisation associée à l'axe de polarité noyau-centrosome

L'activation de la migration en deux dimensions par test de blessure induit l'orientation antérieure de l'axe noyau-centrosome chez les fibroblastes, les cellules endothéliales et les astrocytes. Des études *in vitro* suggèrent que l'orientation de cet axe est corrélé à l'initiation de la migration (Gotlieb et al., 1981; Kupfer et al., 1982; Gundersen and Bulinski, 1988). L'observation directe de la dynamique du centrosome durant la migration, par video-microscopie, a révélé que la formation de la protrusion et la migration des fibroblastes s'effectuent seulement après l'orientation de l'axe noyau-centrosome (Gomes et al., 2005a).

Le mécanisme impliqué dans l'orientation de l'axe noyau-centrosome a été bien étudié chez les fibroblastes et les astrocytes en migration. Il a été démontré que l'orientation de cet axe dépend de la GTPase Cdc42, qui régule différentes voies de signalisation contrôlant le positionnement du centrosome et du noyau. Les mécanismes mis en jeu dépendent du type cellulaire.

Dans les fibroblastes, le centrosome est retenu au centre de la cellule durant l'orientation de l'axe, tandis que le noyau se déplace vers l'arrière de la cellule (Gomes et al., 2005b). La forme active de Cdc42 stimule Par6 et MRCK (myotonic dystrophy related kinase Cdc42-binding kinase) afin de contrôler respectivement les positions du centrosome et du noyau (Gomes et al., 2005b; Palazzo et al., 2001a). MRCK stimule la phosphorylation de la myosine II et l'attachement du noyau aux fibres d'actine qui se déplacent vers l'arrière de la cellule. Par6 interagit avec la protéine kinase C ζ (PKC ζ) afin de maintenir le centrosome près du centre de la cellule via un mécanisme dépendant des microtubules et de la dynéine et impliquant la protéine Par3 (Gomes et al., 2005b; Luxton et al., 2010; Schmoranzler et al., 2009).

Dans les astrocytes, la voie de signalisation dépendante de Cdc42 contrôle aussi l'orientation de l'axe noyau-centrosome. Lors d'un test de blessure, l'activation des intégrines induit l'activation de Cdc42 qui s'accumule au front de migration où elle va activer Par6 et PKC ζ , nécessaires à l'orientation de l'axe de polarité (Etienne-Manneville and Hall, 2001).

Les microtubules contribuent à l'orientation de l'axe noyau-centrosome

Les fibroblastes et les astrocytes nécessitent la dynéine pour l'orientation antérieure de l'axe noyau-centrosome (Palazzo et al., 2001b; Etienne-Manneville and Hall, 2001).

Chez les fibroblastes, la dynéine, requise pour centrer le centrosome, est localisée au niveau de sites corticaux d'ancrage des microtubules (Gomes et al., 2005b; Schmoranzler et al., 2009). La protéine Par3 s'associe spécifiquement à une des deux chaînes légères intermédiaires de la dynéine (LIC2), requise pour l'orientation du centrosome (Schmoranzler et al., 2009). Par3 et LIC2 contribuent à l'augmentation du temps de pause des microtubules au niveau des contacts intercellulaires,

suggérant que Par3 est un récepteur cortical de la dynéine contribuant à l'attachement des microtubules.

Dans les astrocytes, Dlg1 (Discs Large 1) interagit avec APC (Adenomatous Polyposis Coli) à l'extrémité des microtubules afin de polariser le réseau durant la migration. Le complexe Par6-PKC ζ joue un rôle crucial de régulation spatiale d'APC et Dlg1 (Figure 1.13). L'interaction entre APC et Dlg1 fait le lien entre la membrane plasmique basale et l'extrémité positive des microtubules nécessaire à leur ancrage. L'ancrage des microtubules contribue à la réorientation du centrosome en recrutant ou activant le complexe moteur dynéine-dynactine (Etienne-Manneville and Hall, 2001) (Figure 1.13).

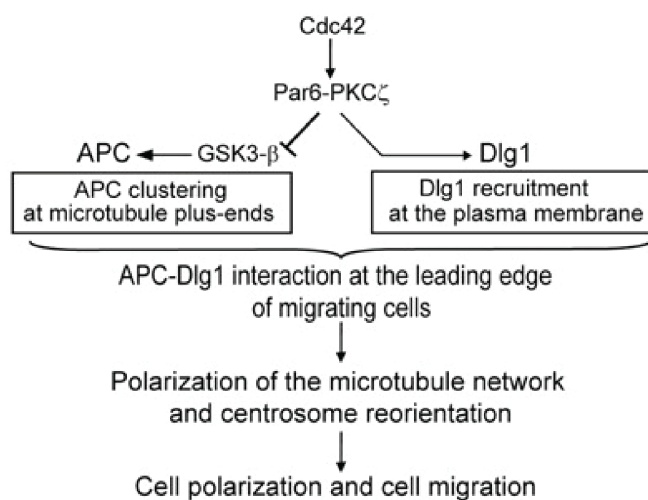


FIGURE 1.13 – Les voies de signalisation contribuant à la polarisation du réseau de microtubules et à la réorientation du centrosome dans les astrocytes

Les voies de signalisation activées au front de migration des astrocytes en migration qui contribuent au contrôle de la localisation d'APC et Dlg1 et qui induisent une polarisation du réseau de microtubules nécessaire à la migration (Etienne-Manneville et al., 2005)

Les fibroblastes et les astrocytes utilisent les mêmes effecteurs afin d'orienter l'axe noyau-centrosome mais ces effecteurs ne sont pas localisés de la même manière dans la cellule durant la migration. Cette différence de localisation peut s'expliquer par la différence de taille de leur protrusion (50-100 μ m dans les astrocytes et 20-30 μ m dans les fibroblastes) et le temps de polarisation du centrosome (6h dans

les astrocytes contre 2h dans les fibroblastes) (Palazzo et al., 2001a; Etienne-Manneville and Hall, 2001).

Les jonction intercellulaires contribuent à l'orientation de l'axe noyau-centrosome

Les jonctions intercellulaires jouent un rôle important dans l'orientation de l'axe de polarité lors de la migration collective.

Dans le laboratoire il a été démontré que les positions du noyau et du centrosome dépendent de la N-cadhérine dans les astrocytes. Une perturbation de l'orientation de l'axe est observée lorsque la N-cadhérine est inhibée (Dupin et al., 2009; Sabatini et al., 2008).

1.4 La dynamique de l'adhésion

Durant la migration collective des astrocytes, les contacts intercellulaires et les sites d'adhésions au substrat sont essentiels à la coordination du mouvement dirigé du groupe de cellules. Je présenterai brièvement la dynamique des jonctions intercellulaires durant la migration collective, et plus particulièrement celle des jonctions adhérentes, essentielles à la régulation de la migration astrocytaire et très bien étudiée au sein du laboratoire. Par la suite je détaillerai la structure et la dynamique des sites d'adhésion à la matrice extracellulaire que j'ai plus particulièrement étudiée durant ma thèse.

Durant la migration cellulaire collective, les cellules interagissent avec l'environnement composé de matrice extracellulaire et avec les cellules avoisinantes. Les adhésions intercellulaires assurent l'intégrité du tissu mais permettent aussi l'invasion d'une ou d'un groupe de cellules à travers le tissu.

1.4.1 La dynamique des jonctions adhérentes durant la migration collective

Chez les vertébrés, les interactions entre cellules sont médiées par différentes structures (Figure 1.14) :

- les jonctions serrées (*zonula occludens*), aussi appelées jonctions imperméables, elles sont spécifiques des cellules épithéliales et endothéliales,
- les desmosomes, généralement observé chez les cellules épithéliales,
- les jonctions communicantes (*macula communicans*), aussi appelées jonctions perméables ou jonctions gap,
- les jonctions adhérentes, présentent dans de nombreux types cellulaires,

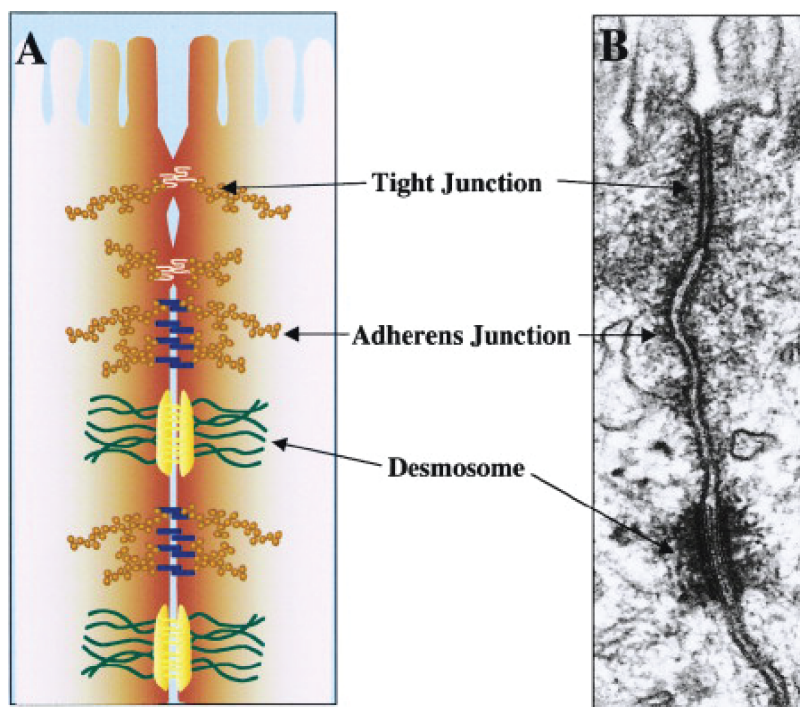


FIGURE 1.14 – Les jonctions intercellulaires

A. Diagramme de trois jonctions intercellulaires dans les cellules épithéliales. Les jonctions serrées ("tight junction") sont composée de protéines transmembranaires liées au réseau d'actine (orange). Les jonctions adhérentes ("adherens junction") sont formées par l'interaction homophile entre les cadhérines tranmembranaires liées au réseau d'actine. Les desmosomes sont formés par l'interaction entre des cadhérines desmosomales et liées aux filaments intermédiaires. **B.** Image de microscopie électronique de cellules intestinales de souris, sur laquelle on peut observer les différentes jonctions intercellulaires (Perez-Moreno et al., 2003)

Durant le développement, le renouvellement et la cicatrisation des tissus, les cellules effectuent de nombreux mouvements dans lesquels les interactions intercellulaires jouent un rôle crucial.

Le mouvement collectif du mesendoderme chez le zebrafish (Arboleda-Estudillo et al., 2010), la formation du conduit mammaire (Ewald et al., 2008) ou le développement de la trachée (Shaye et al., 2008) nécessitent la présence d'adhésions dépendant de cadhérines. Les jonctions adhérentes sont aussi impliquées dans la migration collective durant l'invasion des cellules cancéreuses (Friedl and Gilmour, 2009).

Durant la migration collective des astrocytes, les jonctions adhérentes permettent le maintien des interactions entre les cellules et contribuent à la coordination du mouvement collectif.

Les jonctions adhérentes sont formées par l'interaction entre des glycoprotéines transmembranaires membres de la famille des cadhérines, telle que la E-cadhérine, et de protéines de la famille des caténines telles que la p120, l' α et la β -caténines (Figure 1.15). L'ensemble de ces protéines contrôle la formation, le maintien et la fonction des jonctions adhérentes.

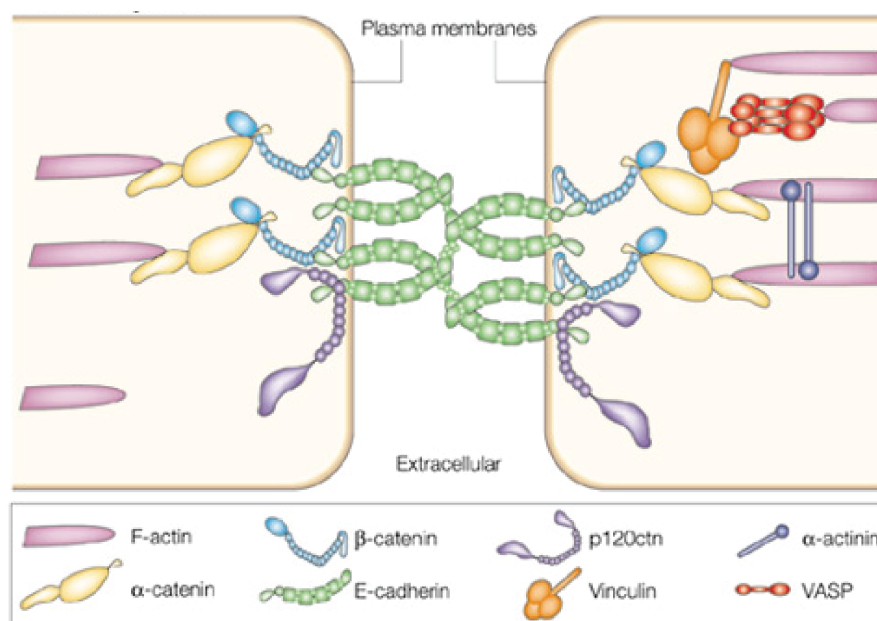


FIGURE 1.15 – **Les jonctions adhérentes**

Modèle simplifié des jonctions adhérentes. Les jonctions adhérentes permettent de faire le lien entre les réseaux d'actine de deux cellules adjacentes. Les cadhérines (en vert) sont liées aux caténines (en jaune). Les caténines servent d'intermédiaire de liaison avec le cytosquelette d'actine (en violet). p120ctn : p120-caténine. (Fuchs and Raghavan, 2002)

Les jonctions adhérentes, qui sont composées principalement de

cadhérines et nectines, jouent un rôle essentiel durant la migration cellulaire. En effet, leurs propriétés mécaniques participent à la coordination entre les cellules durant la migration collective. Elles permettent aussi la transduction de signaux impliqués dans le contrôle de la directionnalité de la polarité et de la migration cellulaire.

Les jonctions adhérentes jouent un rôle mécanique durant la migration cellulaire

Les jonctions adhérentes supportent le stress mécanique associé à la migration cellulaire. Les interactions formées par les cadhérines peuvent générer les forces de protrusion et de contraction nécessaires à la migration (Ladoux et al., 2010).

Les jonctions adhérentes interagissent avec le réseau de microtubules et d'actine via les catenines α , β et p120 (Yap et al., 1998; Aberle et al., 1994). La formation de nouvelles jonctions induit l'assemblage du réseau d'actine.

Les cadhérines jouent un rôle d'ancrage mécanique et de transducteurs qui permettent aux cellules de migrer collectivement. Les cadhérines contribuent aussi à l'orientation de la cellule, à la directionnalité de la migration (Dupin et al., 2009).

Les jonctions adhérentes, une plateforme de signalisation

Les jonctions adhérentes ont des fonctions de signalisation pouvant réguler les réarrangements du cytosquelette et ainsi influencer la migration. En effet les cadhérines peuvent recruter et/ou activer un grand nombre d'effecteurs. Ainsi les jonctions adhérentes contribuent à la migration dirigée en contribuant à la régulation de la polarité cellulaire et la directionnalité de la migration.

Dans le laboratoire, il a été montré que la localisation des jonctions médiées par les cadhérines à la périphérie de la cellule peut être suffisante pour promouvoir l'orientation de la cellule en contrôlant la localisation des plaques d'adhérence et le recrutement polarisé de Cdc42 (Camand et al., 2012). Le centrosome ainsi que l'appareil de golgi s'orientent à l'avant du noyau en direction du front de migration

(Dupin et al., 2011). Cette polarisation est induite par la distribution asymétrique des jonctions adhérentes à la périphérie cellulaire.

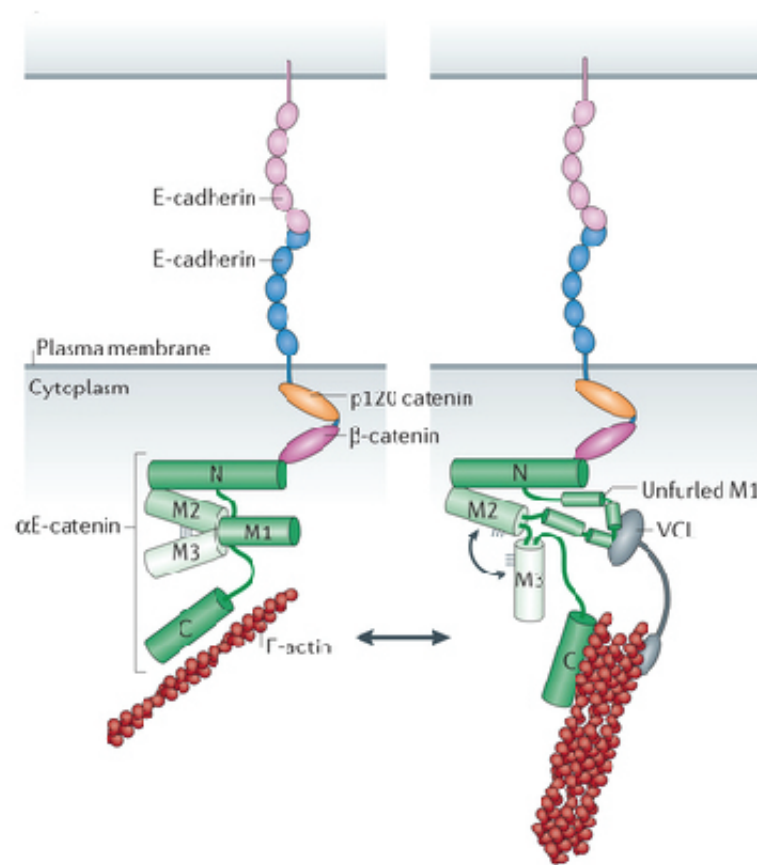


FIGURE 1.16 – Modèle d'interaction entre les différents composants des jonctions adhérentes

Modèle d'interaction entre les complexes caténine-cadhérine, la vinculine (VCL) et les filaments d'actine. La structure cristalline de l' α E-caténine a révélé que les domaines M1 à 3 sont auto-inhibés, ne permettant pas la liaison à la vinculine (gauche). Dans cette conformation fermée, le domaine M3 est en interaction avec les domaines M1 et M2. Dans la forme ouverte de l' α E-caténine, l'interaction entre les domaines M2 et M3 est supprimée et le domaine M1 change de conformation afin d'exposer son site de liaison à la vinculine. Le complexe α E-caténine-vinculine se lie aux filaments d'actine (Takeichi, 2014)

De plus, les composants des jonctions jouent un rôle de senseur mécanique qui permet de guider les cellules suivant les propriétés physiques de leur substrat. Lorsque la rigidité du substrat augmente, les forces exercées par la cellule sur les jonctions augmentent elles aussi (Ladoux et al., 2010). La sensibilité des jonctions à la rigidité du substrat contribue à la directionnalité de la migration en coopérant avec

le cytosquelette d'actine (Maruthamuthu et al., 2010) et en particulier la caténine α qui subit un changement de conformation induit par le stress mécanique (Figure 1.16). Les forces exercées par l'actine augmentent avec la maturation du complexe, les jonctions deviennent plus fortes et résistent mieux au stress mécanique (Ladoux et al., 2010). Les jonctions s'allongent principalement en direction des forces exercées sur elles. Cette croissance anisotrope induit l'orientation du cytosquelette qui va influencer la migration dirigée de la cellule.

1.4.2 L'adhésion à la matrice extra-cellulaire

Durant la migration, la cellule interagit avec la matrice extra-cellulaire via des récepteurs. Cette interaction induit la formation de structures composées de plusieurs protéines formant des complexes et interagissant avec le cytosquelette d'actine. Ces sites d'adhésions permettent à la cellule de percevoir de nombreux signaux extra-cellulaire l'informant des propriétés chimiques et physiques de la matrice extra-cellulaire (Geiger et al., 2009). Différentes cascades de signalisation sont activées afin de moduler les forces générées par ces sites d'adhésions en réponse à la nature du substrat, sa composition chimique (Hersel et al., 2003) et sa rigidité (Discher et al., 2005; Engler et al., 2006) afin de moduler la morphologie de la cellule, sa mobilité et la composition des complexes d'adhésions (Geiger et al., 2009).

Les plaques d'adhérence ont comme fonction l'attachement à la matrice extra-cellulaire, la génération de force via l'interaction avec le cytosquelette d'actine, la polymérisation et la régulation de ce cytosquelette et la transduction de signaux intracellulaires.

Les plaques d'adhérence forment des complexes dynamiques

L'assemblage des plaques d'adhérences est extrêmement régulé et le recrutement des divers protéines formant le complexe s'effectue de manière séquentielle (Zaidel-Bar et al., 2004) (Figure 1.17).

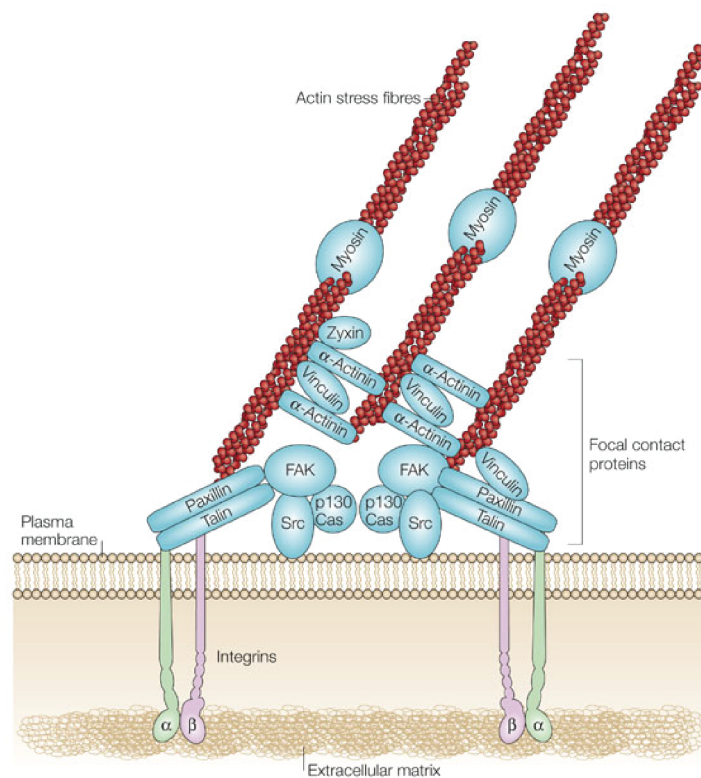


FIGURE 1.17 – **Les jonctions intercellulaires**

La matrice extra-cellulaire, les intégrines (hétérodimères α et β) ainsi que le cytosquelette de la cellule interagissent ensemble au niveau des plaques d'adhérence. Les plaques d'adhérence sont des complexes dynamiques permettant la transduction de nombreux signaux. La paxilline et la taline liées aux intégrines recrutent FAK et la vinculine. FAK phosphoryle l' α -actinine qui se lie à la vinculine et aux fibres d'acto-myosine. La zyxine se lie à l' α -actinine et aux fibres de stress et n'est présente que dans les plaques d'adhérence matures. Src et p130Cas s'associent aux plaques d'adhérence après le regroupement des intégrines (Mitra et al., 2005)

La formation des plaques d'adhérence est initiée par la fixation de récepteurs à la matrice extra-cellulaire à la périphérie de la cellule. Les complexes initialement formés, appelés adhésions naissantes, se lient aux filaments d'actine via la taline (Jiang et al., 2003; Giannone et al., 2009) (Figure 1.18).

A la limite entre le lamellipode et le lamella, les plaques d'adhérences instables se désassemblent et les plus stables s'allongent dans la direction du flux rétrograde d'actine (Alexandrova et al., 2008; Gardel et al., 2008). Cela génère la transduction de forces le long des cables d'actine, renforçant le lien entre les deux structures et induisant le re-

crutement d'autres composants des plaques d'adhérence (Geiger et al., 2009) (Figure 1.18).

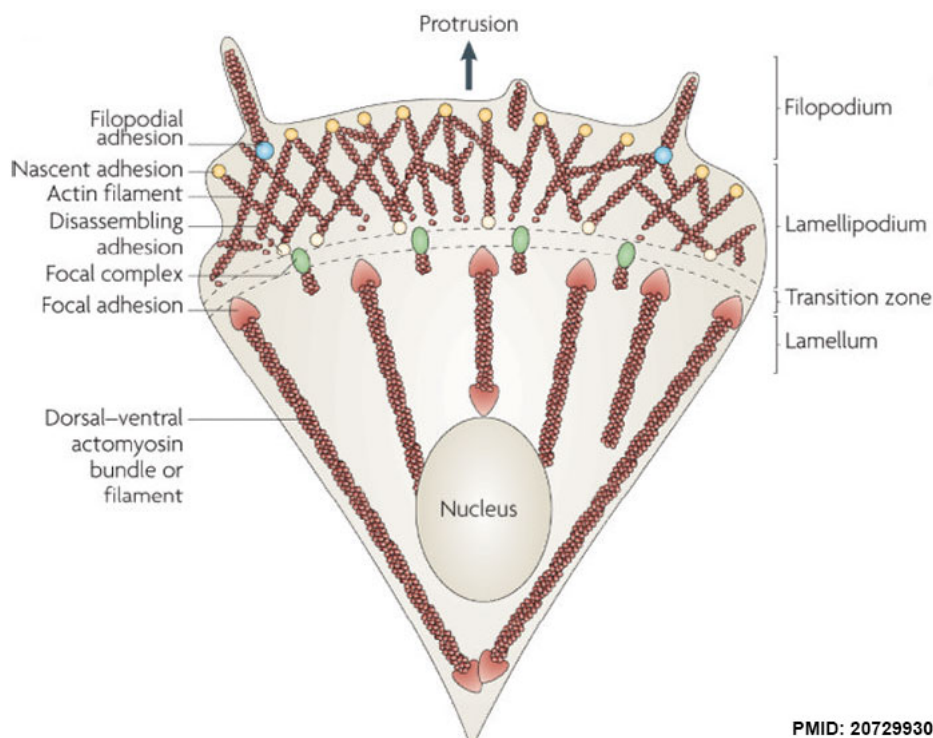


FIGURE 1.18 – **Dynamique de l'adhésion à la matrice extra-cellulaire**

La formation des sites d'adhésion à la matrice-extra-cellulaire est couplé à la formation de la protrusion au front de migration (filopode et lamellipode). Ces sites d'adhésions sont initialement formés dans le lamellipode (nascents adhesion) Ces sites d'adhésions se désassemblent rapidement ou s'allongent à la limite entre le lamellipode et le lamella. Ils vont ensuite maturer afin de former des complexes d'adhésion (Parsons et al., 2010)

La contraction des fibres du complexe d'actomyosine ainsi que la phosphorylation de certains composants des plaques d'adhérence par la FAK (focal adhesion kinase) induit la maturation des sites d'adhésion (Giannone et al., 2009). Par la suite, les plaques d'adhérence se désassemblent via divers mécanismes pouvant impliquer les microtubules que je détaillerai dans le chapitre suivant.

La croissance des plaques d'adhérence étant corrélée au mouvement de la cellule, les sites d'adhésions sont localisés à la périphérie de la cellule et croient en direction du centre de la cellule (Smilenov et al., 1999). Les plaques d'adhérence sont ensuite recyclées (Gardel et al., 2010) (Figure 1.18).

La dynamique des plaques d'adhérence durant la migration cellulaire

Dans les cellules en migration, le renouvellement des composants des sites d'adhésion s'effectue selon un cycle (Figure 1.19). Celui-ci est régulé par l'équilibre entre le taux de recrutement des composants et leur désassemblage durant chaque étape du cycle. A la fin de chaque étape, le complexe se stabilise partiellement durant une certaine durée avant de progresser dans le cycle (Gardel et al., 2010).

Afin de contrôler la migration cellulaire, l'organisation spatiale des protéines des sites d'adhésions est finement régulée. Ainsi l'assemblage, la stabilisation et le désassemblage des plaques d'adhérence s'effectuent dans des régions distinctes (Mohl et al., 2012). Ces régions sont polarisées selon la direction de la migration comprenant l'assemblage des sites d'adhésion à l'avant de la cellule, leur stabilisation dans une région plus large au niveau du lamellipode et leur désassemblage à l'arrière.

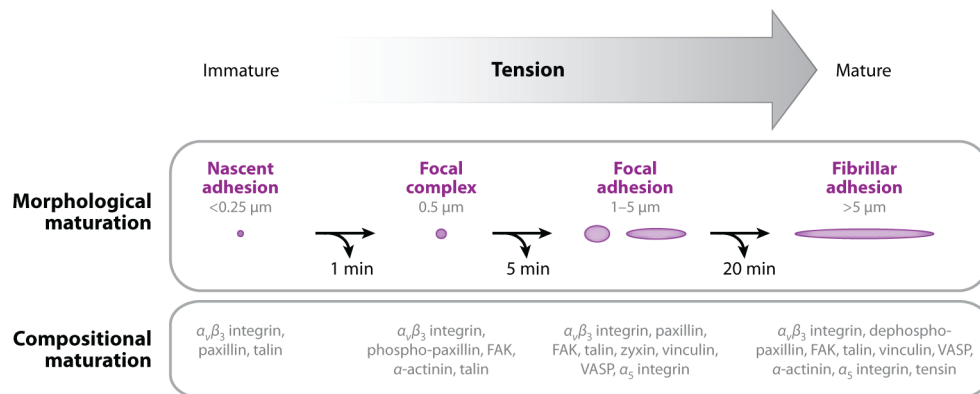


FIGURE 1.19 – **Composition moléculaire des plaques d'adhérence durant leur maturation**

Diagramme schématisant des différents étapes de maturation des plaques d'adhérence et les compositions moléculaires associées à chacune de ces étapes. Les plaques d'adhérence peuvent se désassembler à chaque étape (flèches noires). FAK, focal adhesion kinase ; VASP, vasodilator-stimulated phosphoprotein. (Gardel et al., 2010)

L'assemblage des sites d'adhésions à la matrice extra-cellulaire L'assemblage des plaques d'adhérence est initié, au front de migration, par l'ancrage de récepteurs au composants de la matrice extra-cellulaire (fibronectine, collagène...). Les plaques d'adhérence naissantes apparaissent exclusivement dans le lamellipode.

Les intégrines sont les premiers récepteurs à s'intégrer et se lier à la matrice extra-cellulaire. Ce sont des protéines transmembranaires formant des hétérodimères, composées d'un large domaine extra-cellulaire et une petite partie cytoplasmique. Il existe différents types d'intégrines se liant spécifiquement à certains composants de la matrice extracellulaire (Figure 1.20).

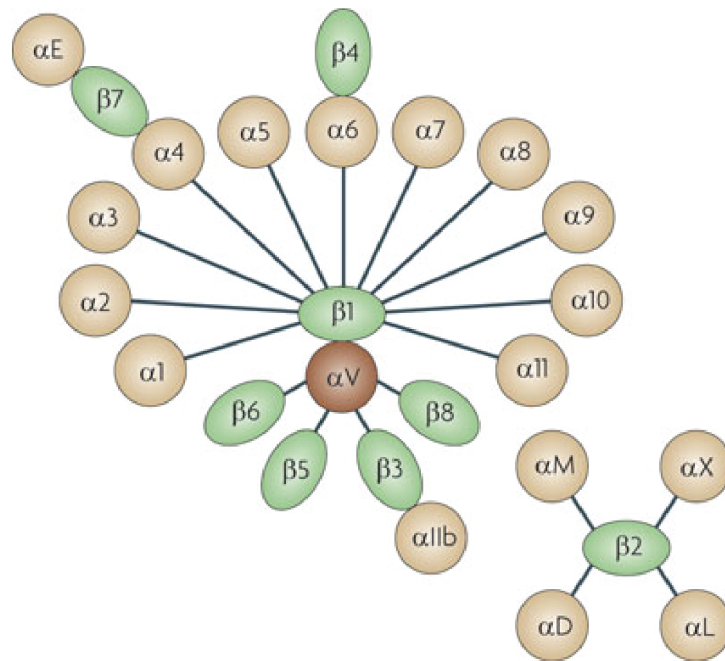


FIGURE 1.20 – La famille des intégrines

Les intégrines sont des hétérodimères formés d'une sous-unité α et une sous-unité β . Il existe 18 types de sous-unité α et 10 types de sous-unité β . en tout, 24 hétérodimères ont été identifiés (Cox et al., 2010).

Suite à la fixation des intégrines aux ligands de la matrice extra-cellulaire, de nombreux signaux intracellulaires sont activés comme par exemple Rac1 et la production de phospho-inositides (Tolias et al., 1995). Cet évènement induit le recrutement de la taline (Martel et al., 2001). Le lien entre la taline et le cytosquelette d'actine permet la stabilisation des liens entre les intégrines et la matrice extra-cellulaire (Nishizaka et al., 2000). La taline est un des composants des plaques d'adhérence les mieux caractérisés. Elle joue un rôle essentiel durant l'assemblage des plaques d'adhérence. Elle se lie au domaine cytosplamique des intégrines induisant leur activation (Mohl et al., 2012). Elle peut aussi se lier directement à l'actine et diverses proteines de signalisation

associées au cytosquelette (Critchley et al., 2008).

Le recrutement des protéines au niveau des sites d'adhésion s'effectue de manière séquentielle. Ainsi la composition protéique des plaques d'adhérence est dépendante de leur âge. Les sites d'adhésion sont composés initialement des intégrines, taline, paxilline et un faible taux de vinculine et FAK (Zaidel-Bar et al., 2004) (Figure 1.19).

Parmi les composants initiaux des plaques d'adhérence, FAK, pouvant se lier à Src (Schaller et al., 1999), est activé (Laird et al., 2003) et phosphoryle la paxilline et p130cas (Panetti, 2002). FAK induit aussi l'inhibition de l'activité de Rho permettant le renouvellement des sites d'adhésion (Ren et al., 2000). p130cas facilite en retour la formation du complexe Rac-GEF, induisant la formation de la protrusion (Huveneers and Danen, 2009). La paxilline possède de nombreux domaines permettant la liaison de diverses molécules de signalisation, de composants des sites d'adhésion et de protéines associées à l'actine (Deakin and Turner, 2008).

Le recrutement de la vinculine induit le regroupement des intégrines qui forment un pont flexible entre les récepteurs et le réseau d'actine (Giannone et al., 2003). La vinculine participe aussi à la stabilité mécanique du complexe en régulant les forces de contraction (Mierke et al., 2008).

Enfin dans les stades les plus tardifs, les plaques d'adhérence sont composées aussi d'un taux élevé de vinculine, d' α -actinine, FAK, VASP et un faible taux de zyxine (Zimerman et al., 2004).

La croissance des plaques d'adhérence Toutes les adhésions naissantes ne poursuivent pas leur croissance. Certaines se désassemblent et seulement une petite partie persiste et progresse dans leur cycle de croissance. Les sites d'adhésion naissants qui ne se sont pas désassemblés, persistent et deviennent plus stables et larges. La plupart des plaques d'adhérence possèdent une taille qui varient entre 0.5 et 1 μ m. Elles sont majoritairement observées à la limite entre le lamellipode et le lamella (Bershadsky et al., 1985). Elles contribuent à la stabilisation du lien entre le substrat et le cytosquelette d'actine et permettent la transduction de signaux chimiques et mécaniques.

Durant cette phase transitoire, les sites d'adhésion vont croître ou se désassembler selon les forces mécaniques générées et la rigidité du substrat (Walcott et al., 2011). La différence entre la force de poussée liée à la polymérisation de l'actine et la force de traction liée à la contraction de du complexe d'actomyosine donne lieu à une force de traction sur le substrat et induit la génération de forces de propulsion de l'ordre de $5\text{nN}/\mu\text{m}$ au front de migration des cellules (Balaban et al., 2001). Les forces de propulsion sont plus intenses durant cette phase de transition et diminuent lorsque les plaques d'adhérence croissent (Beningo et al., 2001).

Les forces transmises à travers les éléments mécano-sensibles, composants des sites d'adhésion induisent des changements de conformation des protéines liées à l'actine, ce qui contribue à l'assemblage des composants des plaques d'adhérence (Geiger et al., 2009). A l'inverse, la réduction de la tension induit la dissociation des sites d'adhésion.

La maturation des plaques d'adhérence Les plaques d'adhérence qui persistent au sein du lamellipode et continuent de croître subissent une maturation caractérisée par certains changements de dynamique et de composition du complexe, de l'activité de Rho GTPase (Nobes and Hall, 1995), de l'interaction entre l'actine et l' α actinine (Choi et al., 2008) et de la contractilité de l'acto-myosine (Vicente-Manzanares et al., 2009). L'ensemble de ces événements se produisent durant la contraction du lamellipode (Roca-Cusachs et al., 2012).

Les myosines IIa et IIb coopèrent avec l'actomyosine afin de stabiliser les plaques d'adhérence (Vicente-Manzanares et al., 2011). Cela induit la formation de faisceaux d'actine liés aux sites d'adhésion au niveau de la face ventrale de la cellule formant des structures appelées fibres de stress (Le Clainche et al., 2008). Les fibres de stress participent à la mécanotransduction des plaques d'adhérence (Geiger et al., 2009) et peuvent générer d'importantes forces (Yeung et al., 2005) via la contractilité du complexe d'actomyosine. La génération de forces à travers les sites d'adhésion influence la dynamique de l'actine et la signalisation intracellulaire induisant un renforcement et la maturation des plaques d'adhérence (Geiger et al., 2009).

Les plaques d'adhérence se désassemblent quelque minutes plus

tard ou murent en sites d'adhésion dits fibrillaires (Laukaitis et al., 2001; Webb et al., 2004) pouvant remodeler la matrice extra-cellulaire. Ensuite l'importante activité de Src inhibe la fonction et la contractilité des intégrines ne pouvant plus s'associer avec la matrice (Huvneers et al., 2008).

Les plaques d'adhérence matures ont une longueur variant entre 1 à $5\mu\text{m}$ et comprennent environ 150 protéines (Zaidel-Bar et al., 2007). Plusieurs de ces composants sont organisés en couches fonctionnelles d'une hauteur d'environ 40nm entre le lien des intégrines avec la matrice et le cytosquelette d'actine (Kanchanawong et al., 2010). Parmi les composants des plaques d'adhérence, la présence de zyxine et le faible taux de tensine permet de distinguer les plaques d'adhérence matures de celles qui ne le sont pas (Zaidel-Bar et al., 2004).

Le désassemblage et le renouvellement des plaques d'adhérence Le désassemblage des plaques d'adhérence est un événement crucial pour la mobilité de la cellule et le renouvellement des sites d'adhésion (Partridge and Marcantonio, 2006). Le désassemblage peut prendre place suite à la translocation de l'arrière de la cellule après maturation des plaques d'adhérence ou à la base de la protrusion lors de leur renouvellement. Le désassemblage est induit généralement par des événements de phosphorylation/déphosphorylation et des changements de tension du cytosquelette (Crowley and Horwitz, 1995) régulés par la calpaine (Franco and Huttenlocher, 2005) et les microtubules.

Les microtubules régulent négativement la contractilité cellulaire et accélèrent ainsi le désassemblage (Small et al., 2002). Ils peuvent s'associer au sites d'adhésion (Kaverina et al., 1998) et éventuellement induire la déstabilisation des faisceaux d'actine liés aux sites d'adhésion (Kaverina et al., 1999). En effet les microtubules peuvent induire l'inhibition de Rho (Peacock et al., 2007), l'endocytose des intégrines dépendante de la clathrine et la déstabilisation des complexe via FAK (Broussard et al., 2008). La kinésine est aussi impliquée dans la régulation du désassemblage des sites d'adhésion par les microtubules en contrôlant l'apport de composant du complexe pour retarder leur croissance et ainsi contribuer à leur désassemblage (Krylyshkina et al., 2002).

La voie de signalisation FAK-Src joue un rôle important dans le renouvellement des sites d'adhésion à l'avant de la cellule (Webb et al., 2004) via la phosphorylation de MLCK (myosin light chain kinase) qui augmente la contractilité du complexe d'actomyosine (Klemke et al., 1997). Sous l'effet de force, l'importante densité d'intégrines induit un lien moins stable entre les intégrines et la matrice (Ballestrem et al., 2001) et la séparation de leur lien avec l'actine permet le relargage des récepteurs (Laukaitis et al., 2001). La protéolyse de certains composants comme la taline (Franco et al., 2004) et FAK (Chan et al., 2010) par la calpaïne est aussi impliquée dans le désassemblage des sites d'adhésion.

La signalisation dépendant des intégrines

Le regroupement des intégrines et leur association avec les ligands de la matrice extra-cellulaire seraient suffisants pour induire des signaux de transduction (Schvartzman et al., 2011). La région requise pour l'assemblage des plaques d'adhérence et la transmission de force est limitée et régulée par la coopération entre les forces générées par l'adhésion au substrat et la tension induit par le cytosquelette (Coyer et al., 2012) (Figure 1.21).

Le complexe formé par l'actine, la taline et les intégrines stabilise les plaques d'adhérence et les fibres de stress via le recrutement de nombreux composants additionnels comme FAK (Shi and Boettiger, 2003), la paxilline (Brown et al., 1996) et les SFKs (Src-family kinases) (Arias-Salgado et al., 2003). La taline induit la production de PIP2 et l'activation de FAK (Ling et al., 2002; Kong et al., 2006). FAK renforce le complexe en recrutant la taline (Lawson et al., 2012). La polymérisation de l'actine induite par Src pousse les complexes vers l'extérieur.

La contractilité du complexe d'acto-myosine étire la taline (Margadant et al., 2011), révélant d'autres sites de fixation pour divers composants comme la vinculine (del Rio et al., 2009).

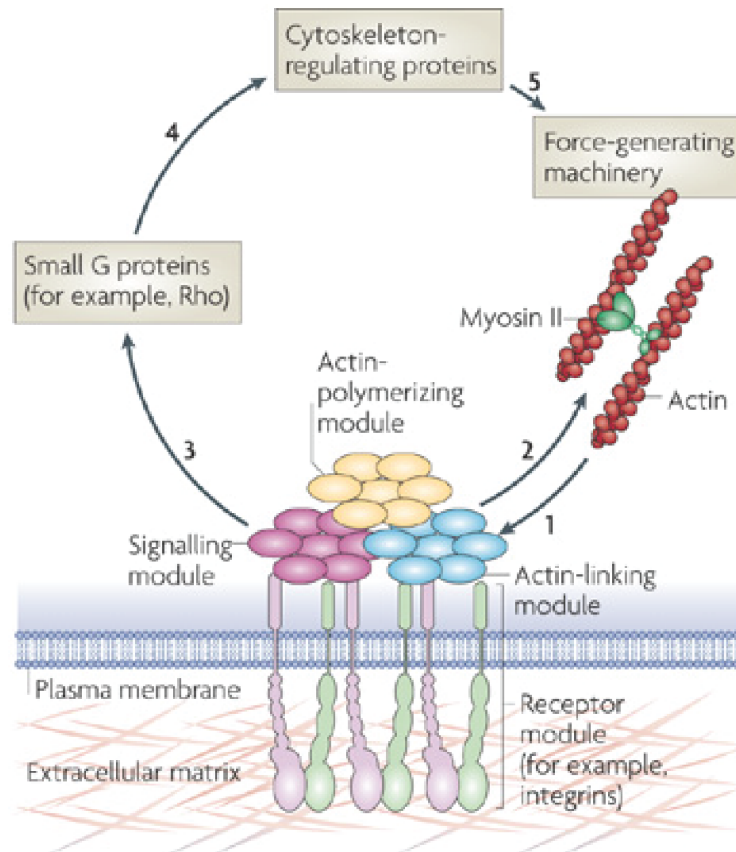


FIGURE 1.21 – **L’association des intégrines entre elles et le cytosquelette d’actine et les signaux induits**

Les forces générées par la polymérisation de l’actine et la contractilité médiée par la myosine II affectent les mécano-sensibilités des protéines liées à l’actine (actin-linking module) (talin et vinculine), les intégrines (receptor module), les protéines liées à la polymérisation de l’actine (actin-polymerizing module (for example, zyxin and formins) et les protéines associées à la signalisation intracellulaire (the signalling module) représentée par exemple par FAK et p130CAS) (étape 1). L’interaction du système avec la matrice extra-cellulaire et les forces impliquées induisent en réponse une perturbation du cytosquelette d’actine (étape 2). L’interaction du système active une réponse intracellulaire via l’activation de certains effecteurs comme Rho (étape 3). L’activation de ces protéines et de certaines voies de signalisation affectent la polymérisation de l’actine et la contractilité de l’actomyosine (étape 4) modulant ainsi les forces appliquées par le système (étape 5) (Geiger et al., 2009).

L’adhésion dépendante des intégrines régule l’activation des GTPases Rho. Le complexe FAK-Src active différentes voies de signalisation dont celles dépendantes de Cdc42. L’activation des intégrines induit une auto-phosphorylation de FAK et induit sa liaison avec Src (Mitra and Schlaepfer, 2006). Ce complexe peut phosphoryler la Paxilline qui recrute β PIX (Ten Klooster et al., 2006) et induit l’activation

de Cdc42 et de ses voies de signalisation dont celle incluant Par6, aPKC et APC (Figure 1.22).

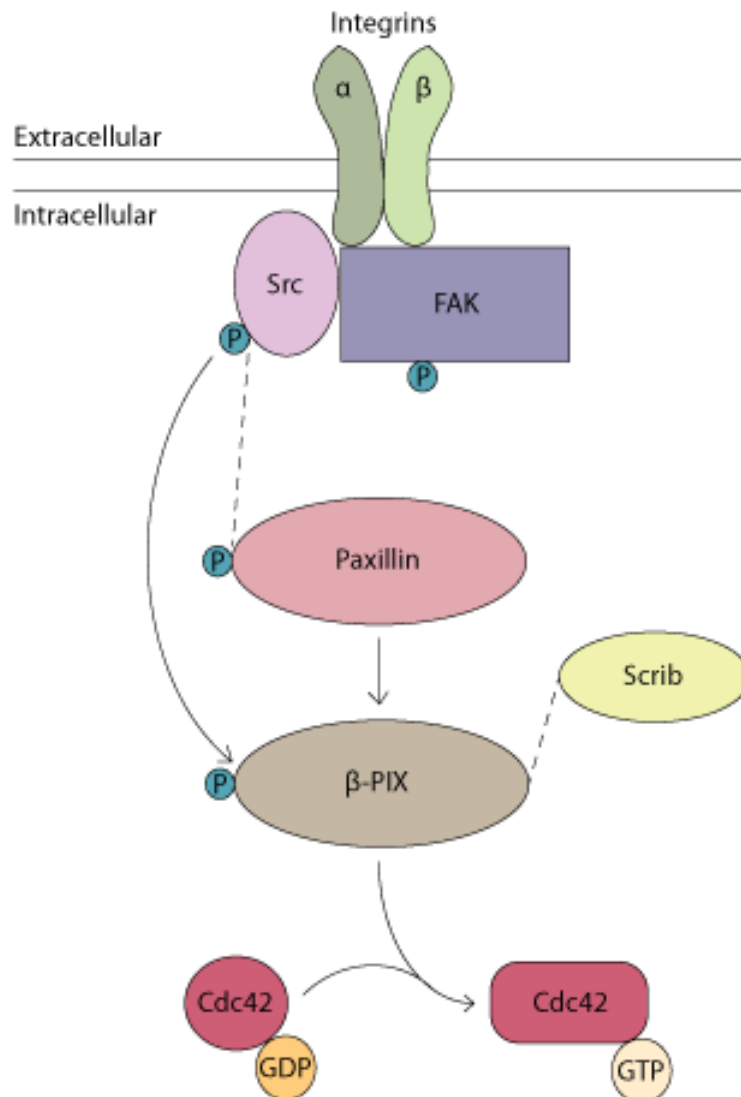


FIGURE 1.22 – L'intégration des intégrines à l'avant induit l'activation de Cdc42

L'accumulation et l'activation de Cdc42 au front de migration résultent d'une signalisation induite par l'activation des intégrines. L'interaction entre Scrib, βPIX et la phosphorylation de Src au front de migration induit l'activation de Cdc42 et de sa voie de signalisation incluant Par6, aPKC et APC. adapté de (Huveneers and Danen, 2009).

En résumé,

- Les cellules peuvent migrer de manière individuelle ou collective. La migration d'une cellule nécessite l'établissement d'un axe de polarité avant-arrière induit par un réarrangement polarisé du cytosquelette et la polarisation du trafic membranaire. En réponse à une inflammation/lésion, les astrocytes se polarisent et migrent en direction de la blessure afin de cicatrifier le tissu lésé. Ce type cellulaire est un excellent modèle pour étudier *in vitro* les mécanismes de régulation de la mise en place de la polarité et de la migration cellulaire.
- Durant la migration collective, les sites d'adhésions inter-cellulaires et cellule-matrice jouent un rôle crucial. Les sites d'adhésion à la matrice extra-cellulaire sont des complexes moléculaires dynamiques essentiels à la génération de force via leur interaction avec le cytosquelette d'actine et à la transduction de signaux intra-cellulaires.

2

2.1 Structure et organisation

2.1.1 La tubuline, sous-unité des microtubules

Les microtubules sont des filaments protéiques cylindriques présents chez tous les eucaryotes. La tubuline, sous-unité structurale des microtubules, est une protéine hétérodimérique composée de deux chaînes polypeptidiques nommées tubuline α et β (Ponstingl et al., 1981; Krauhs et al., 1981). Les monomères de tubuline α et β ont une masse moléculaire d'environ 55kDa et interagissent entre elles de manière non covalente pour former un hétérodimère stable (Wade, 2009). Chaque monomère est composé de trois domaines fonctionnels (figure 2.1.A) :

- le domaine amino (N)-terminal contenant le site de liaison à la guanine tri-phosphate (GTP),
- un domaine intermédiaire contenant le site de fixation au taxol au niveau de la β -tubuline,
- un domaine carboxy (C)-terminal formant probablement le site d'interaction pour de nombreuses protéines associées aux microtubules (MAPs) (Nogales et al., 1998a; Nogales and Wang, 2006).

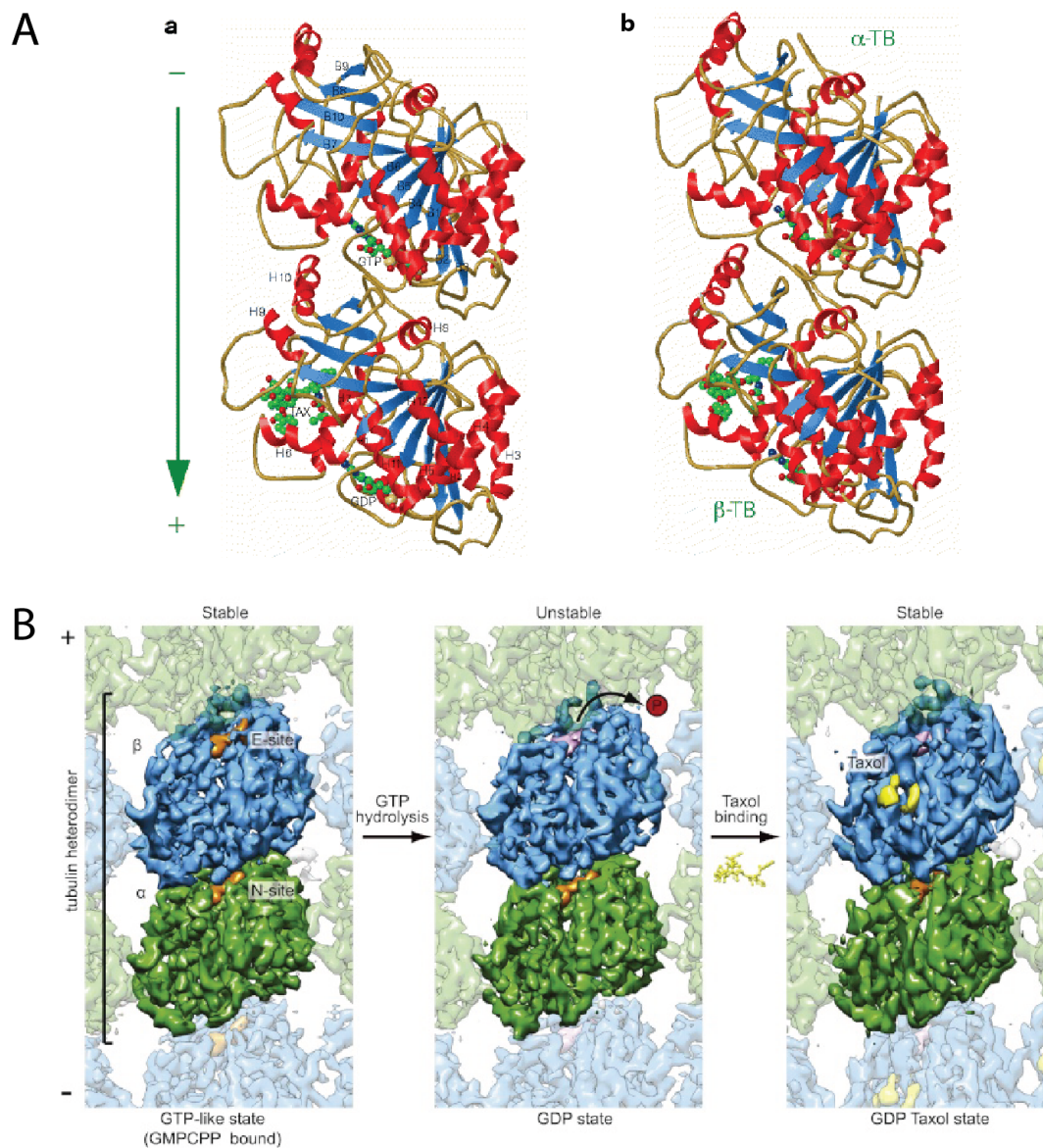


FIGURE 2.1 – Structure de la tubuline α et β

A. Schéma représentant la tubuline α et le GTP lié (en haut), et la tubuline β contenant le GDP et le taxol (en bas). La fleche indique la direction du protofilament et l'axe du microtubule. **a.** Vue de la face externe supposée du microtubule. **b.** Vue arriere de la face interne supposée du microtubule (Nogales et al., 1998b). **B** Structures obtenues par cryo-EM des microtubules dynamiques et stabilisés. Vues depuis la face interne. La tubuline α est en vert ; la tubuline β en bleu ; GTP/GMPCPP en orange ; GDP en rose ; le taxol en jaune (Alushin et al., 2014)

Chaque monomère de tubuline lie un nucléotide, la guanine. Le GTP lié à la tubuline α n'est pas hydrolysé durant la polymérisation du

microtubule et n'est pas interchangeable (Desai and Mitchison, 1997). Cependant, le GTP lié à la sous-unité β est exposé à la surface du dimère et peut être hydrolysé durant la polymérisation (figure 2.1.B). Chez la plupart des eucaryotes, la famille de gène codant pour la tubuline permet l'expression de plusieurs isotypes (Wade, 2007). L'expression de ces multiples gènes génère une large variété de sous-unités de tubuline α et β légèrement différentes. Chaque isotype diffère de part leur séquence d'acide aminé et/ou leur distribution temporelle, tissulaire et subcellulaire (Ludueña, 1998). Les deux monomères peuvent aussi subir différentes modifications post-traductionnelles. Les différents isotypes et modifications post-traductionnelles seront abordés dans le chapitre 2.3.2.

2.1.2 Structure cylindrique des microtubules

Les microtubules sont des cylindres de 25nm de diamètre ayant une longueur variable. L'hétérodimère de tubuline α et β s'assemblent tête-bêche afin de former des protofilaments linéaires, qui s'associent latéralement pour former les microtubules (figure 2.2). Les microtubules communément observés *in vivo* possèdent 13 protofilaments (Ledbetter and Porter, 1964), cependant dans certaines cellules comme chez *Caenorhabditis elegans*, les microtubules peuvent posséder 15 protofilaments (). *In vitro*, les microtubules peuvent posséder de 12 à 15 protofilaments (Wade et al., 1990).

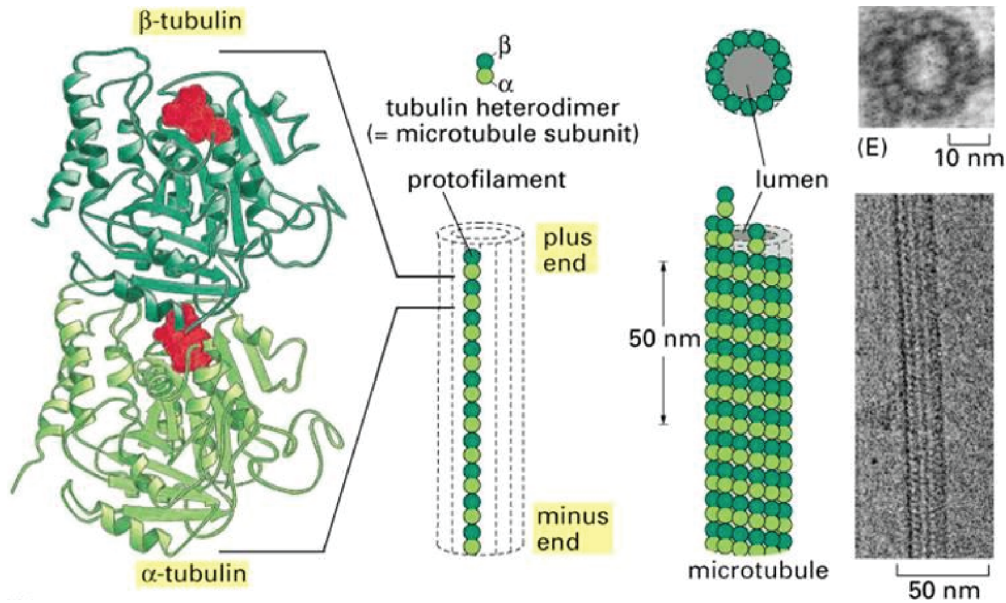


FIGURE 2.2 – **Structure d'un microtubule**

La sous-unité de chaque protofilament est l'hétérodimère de tubuline α et β . Chaque protofilament est formé par l'association des sous-unités. L'assemblage latéral des 13 protofilaments permet la formation du microtubule. A droite, un segment de microtubule vue par microscopie electronique (en bas) et une coupe de ce microtubule montrant les 13 protofilaments (en haut) d'après Molecular Biology of the Cell, 4eme édition

Les microtubules possèdent une polarité intrinsèque, générée par l'assemblage tête-bêche des sous-unités de tubuline α et β . Ils possèdent une extrémité "+" ou positive, qui croît plus rapidement *in vitro* et une extrémité "-" ou négative, moins dynamique, avec une croissance plus lente.

L'extrémité négative est généralement ancrée au centrosome ou à d'autres site stabilisateurs (Dammermann et al., 2003), tandis que l'extrémité positive explore l'espace cytoplasmique et interagit souvent avec le cortex cellulaire et d'autres structures. La polarité des microtubules est essentielle pour le mécanisme d'action des moteurs moléculaires, les kinésines et les dyneines, qui utilisent l'hydrolyse de l'ATP pour transporter divers cargos le long des microtubules. Les moteurs moléculaires fonctionnent généralement de manière unidirectionnelle : les kinésines avancent vers l'extrémité positive, les dynéines ainsi que quelques kinésines, vers l'extrémité négative (Mallik and Gross, 2004). Certaines kinésines peuvent fonctionner bidirectionnellement (Britto et al., 2016; Popchock et al., 2017).

2.1.3 Organisation des microtubules dans la cellule

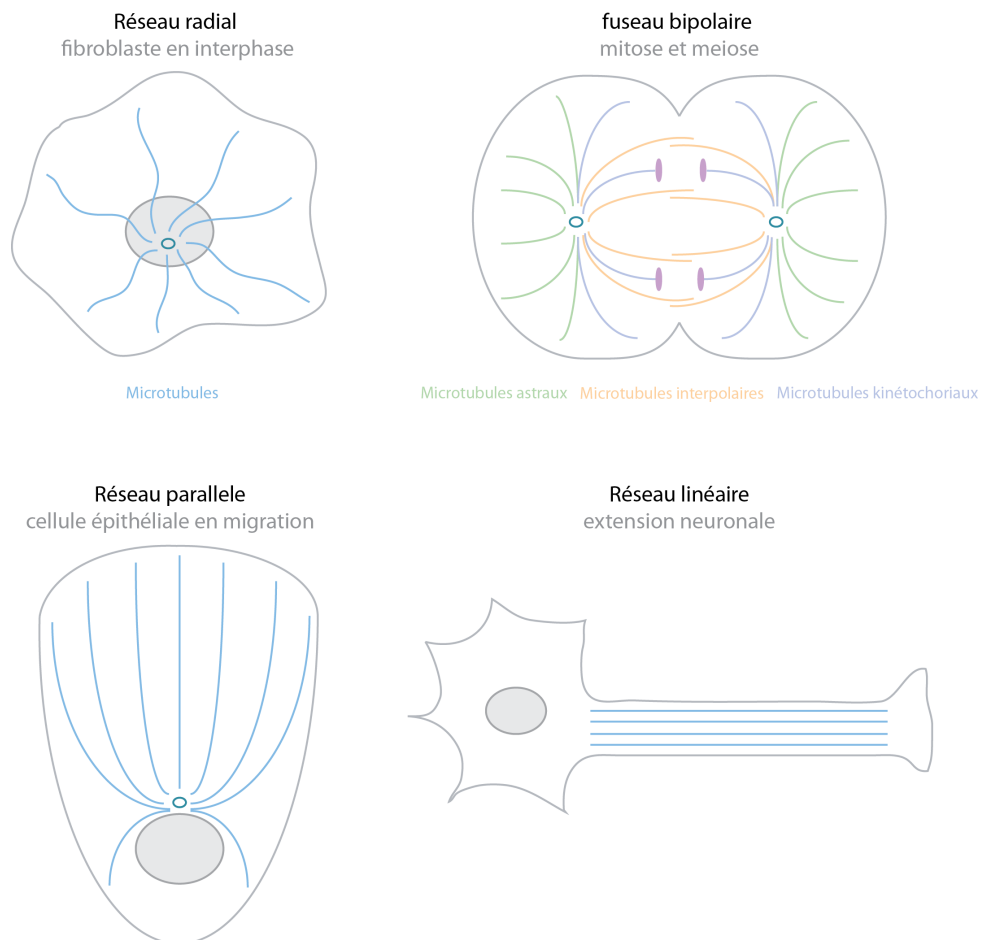


FIGURE 2.3 – Les différentes organisations du réseau de microtubules
Le noyau est en gris ; le centrosome en bleu foncé ; les chromosomes en violet

Au sein des cellules, le réseau de microtubules peut être organisé sous différentes formes, comme par exemple en réseau radial dans les fibroblastes, sous forme de fuseau bipolaire durant la mitose et la méiose, en réseau parallèle dans les cellules en migration, et en réseau linéaire dans les extensions neuronales (figure 2.32). De plus, les microtubules forment aussi des structures stables telles que les centrioles, le corps basal et les axonèmes des cils et flagelles.

2.2 La dynamique des microtubules

2.2.1 L'instabilité dynamique des microtubules

A partir de tubuline purifiée, les microtubules peuvent s'assembler spontanément en solution. L'observation d'une population fixée de ces microtubules a permis de caractériser l'instabilité dynamique des microtubules, qui consiste en l'alternance de phase de polymérisation et dépolymérisation des filaments (Mitchison and Kirschner, 1984). Les transitions entre croissance et raccourcissement du filaments ou raccourcissement et croissance sont respectivement définies comme "catastrophe" et "sauvetage" (Mitchison and Kirschner, 1984) (Figure 2.4). Parfois les microtubules ne se polymérisent ni se dépolymérisent, on dit qu'ils sont en pause. Ce phénomène est plus fréquent *in vivo*, mais peut être aussi observé *in vitro* (Desai and Mitchison, 1997). Les mécanismes de sauvetage des microtubules est encore incompris mais certaines études ont démontré l'existence d'une réparation du réseau *in vitro* (Schaedel et al., 2015) et *in vivo* (Aumeier et al., 2016) qui contribue au sauvetage des microtubules

La dynamique des microtubules joue un rôle essentiel dans l'organisation et le remodelage rapide du cytosquelette, permettant aux microtubules d'explorer l'environnement cytoplasmique (Kirschner and Mitchison, 1986). La dynamique des microtubules est régulée durant le cycle cellulaire : les microtubules en interphase ont un "turnover" de plusieurs minutes tandis qu'en mitose, celui-ci ne dure que quelques secondes (McNally, 1996). Généralement, les microtubules *in vivo* possèdent un taux de polymérisation rapide et une haute fréquence de "catastrophe" et "sauvetage" (Cassimeris et al., 1988). Cela implique l'existence de facteurs cellulaires modulant de manière indépendante la dynamique des microtubules *in vivo*, soit en contribuant à leur croissance, en augmentant les fréquences de transition, ou en affectant la stabilité des microtubules (Cassimeris, 1993; Howard and Hyman, 2007).

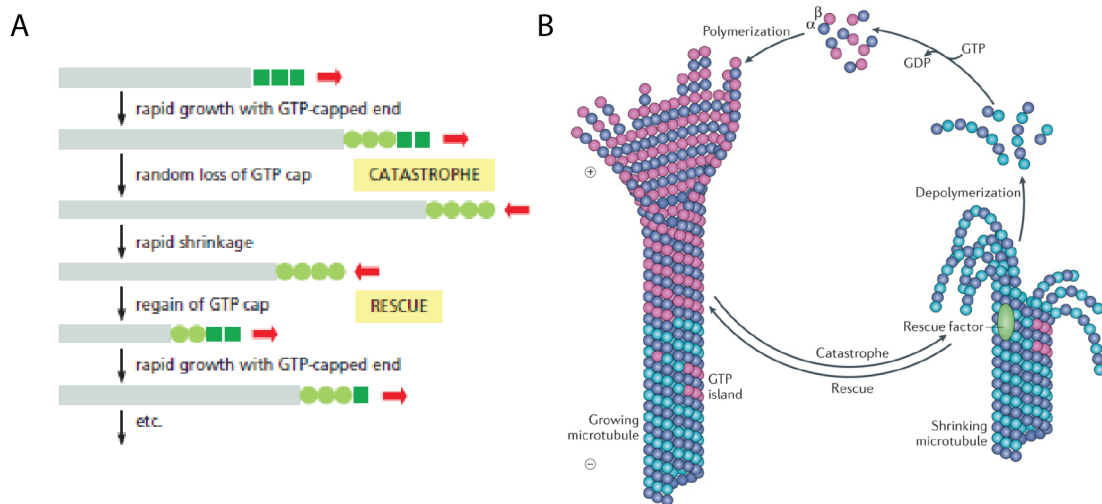


FIGURE 2.4 – L'instabilité dynamique des microtubules

A. Si la concentration de tubuline libre en solution est comprise entre celles de la tubuline liée au GTP et celle liée au GDP, alors le microtubule peut alterner entre des phases de croissance et de rétrécissement. Un microtubule qui croît possède à son extrémité une sous-unité liée à un GTP, formant un capuchon. Si l'hydrolyse du nucléotide se fait plus rapidement que l'addition d'une sous-unité, le capuchon disparaît et le microtubule va rétrécir. Cet événement est nommé "catastrophe". Mais la sous-unité liée au GTP peut toujours être ajoutée à l'extrémité qui rétrécit et ainsi reformer un capuchon et recroître. Ce phénomène est nommé "sauvetage".
B. Le cycle de polymérisation/dépolymérisation des microtubules. Les dimères de tubuline liés au GTP sont incorporés au sein des microtubules qui se polymérisent. L'hydrolyse du GTP s'effectue après l'incorporation du dimère. L'extrémité croissante des microtubules possède une extrémité stabilisée par un capuchon GTP. La perte de celui-ci induit une rapide dépolymérisation, appelée "catastrophe". La présence d'îlots GTP au sein du microtubule peut induire un "sauvetage" (Akhmanova and Steinmetz, 2015)

2.2.2 Régulation de l'instabilité dynamique des microtubules

La dynamique des microtubules est caractérisée par 4 paramètres :
 — la vitesse de polymérisation des microtubules,
 — la vitesse de dépolymérisation des microtubules,
 — la fréquence des événements de catastrophe,
 — la fréquence des événements de sauvetage.

De plus, les microtubules peuvent aussi effectuer des pauses, événement fréquemment observé dans les cellules animales.

Les microtubules peuvent être stabilisés de différentes manières

(Figure 2.5) :

- en maintenant une croissance persistante ou en prolongeant l'interaction des microtubules avec les sites ciblés afin de prévenir les évènements de catastrophe.
 - en sauvant un microtubule qui se dépolymérise via une réduction des phases de raccourcissement
 - en diminuant la vitesse de dépolymérisation du microtubule.
- sinon les microtubules seront déstabilisés.

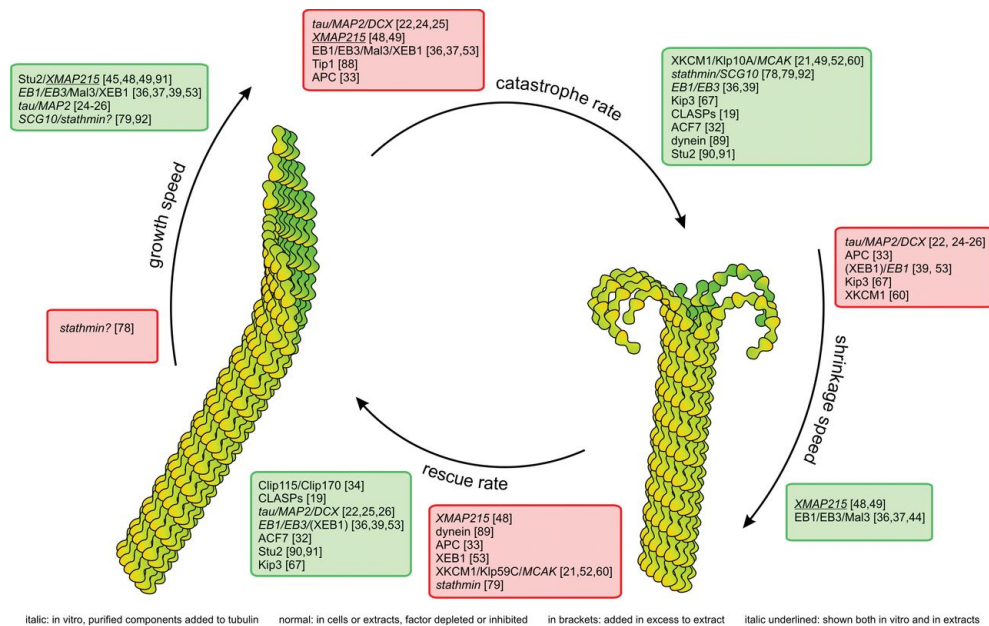


FIGURE 2.5 – Les différents facteurs modulant l'instabilité dynamique des microtubules

La dynamique des microtubules peut être régulée via 4 paramètres : la vitesse de croissance et de dégradation des microtubules ainsi que la fréquence des transitions (catastrophes et sauvetage). Différentes protéines peuvent moduler ces paramètres. En vert, ceux régulant positivement la dynamique des microtubules, en augmentant la fréquence de transition ou la vitesse de croissance ; en rouge, ceux régulant négativement la dynamique des microtubules, en supprimant les transitions ou réduisant la vitesse de croissance des microtubules (ven der vaart B, akhmanova A, 2009)

L'instabilité dynamique des microtubules, ainsi que les connections entre les microtubules et les structures cellulaires, sont spatialement et temporellement régulées par de nombreuses protéines qui peuvent être regroupées en 2 catégories : les MAPs et les moteurs moléculaires (Desai and Mitchison, 1997).

Parmi les MAPs, les +TIPs (microtubule plus-end tracking protein), protéines régulant la dynamique des microtubules, ont la particularité d'être concentrées à l'extrémité "+" croissante des microtubules (Schuyler and Pellman, 2001; Akhmanova and Steinmetz, 2008) (Figure 2.6).

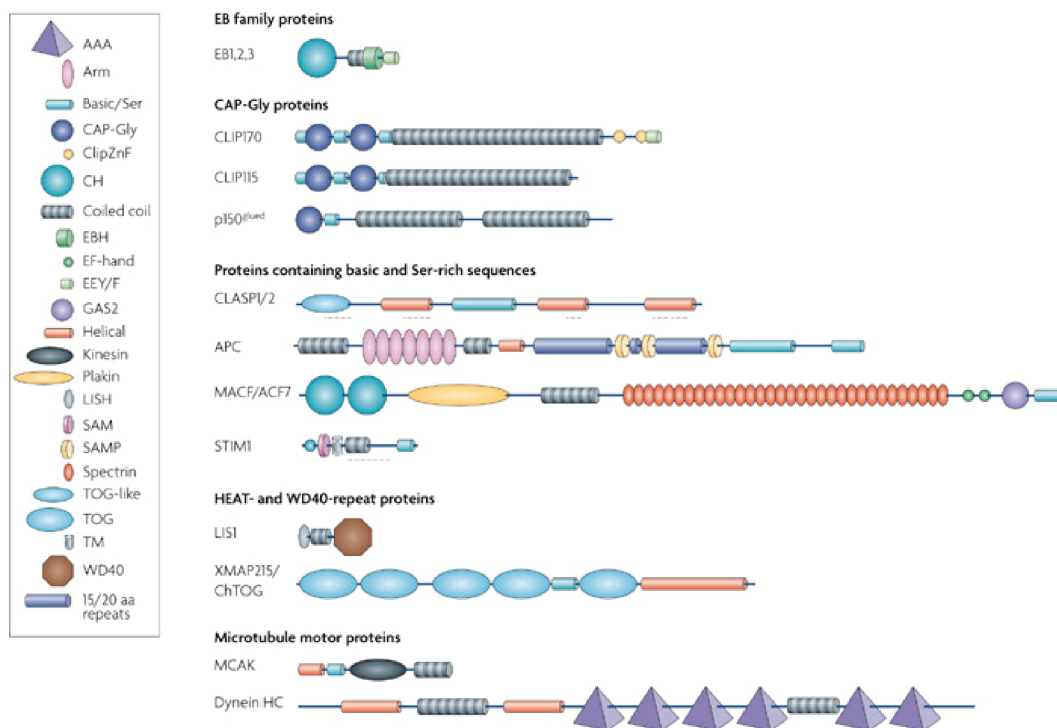


FIGURE 2.6 – La classification structurale des +TIPs

Le schéma ci-dessus liste les différentes +TIP ainsi que les éléments structuraux qui les composent (Akhmanova and Steinmetz, 2008)

Certaines protéines associées aux microtubules, comme tau, MAP2, MAP4 décorent le réseau de microtubules et le stabilise, en diminuant considérablement la fréquence de catastrophe mais aussi en augmentant la croissance et en réduisant la vitesse de dégradation des microtubules.

Les protéines EBs

Il est possible de différencier deux catégories de +TIPs, les premières interagissant directement avec l'extrémité croissante des microtubules, et les deuxièmes ayant une affinité pour les microtubules mais étant recrutées par les premières.

Les protéines EBs (end-binding proteins) font partie de la première catégorie et sont recrutées indépendamment d'autres facteurs. Dans les cellules de mammifères, trois EBs sont principalement exprimées, EB1, 2 et 3, tandis que la levure ne contient qu'une unique EB, Bim1 (binding to microtubules 1) chez *Saccharomyces cerevisiae* et Mal3 chez *Schizosaccharomyces pombe*

Les protéines EBs contiennent un domaine CH (calponin homology) terminal (Hayashi and Ikura, 2003), suivi d'une région variable et d'un domaine coiled-coil. Ce domaine coiled-coil permet l'homodimérisation et l'hétérodimérisation des monomères d'EBs (De Groot et al., 2010; Slep et al., 2005) et serait impliqué dans le contrôle de l'interaction directe entre le GTP et les protéines EBs (Gireesh et al., 2014). Le domaine coiled-coil s'étend en un faisceau de quatre hélices et une queue désordonnée finissant par un motif carboxy-terminal EEY/F. Le faisceau de quatre hélices et la première partie de la queue carboxy-terminale définissent le domaine EBH (EB homology domain). Le domaine carboxy-terminal des EBs possède des sites de liaison à de nombreuses protéines +TIPs (Figure 2.7)

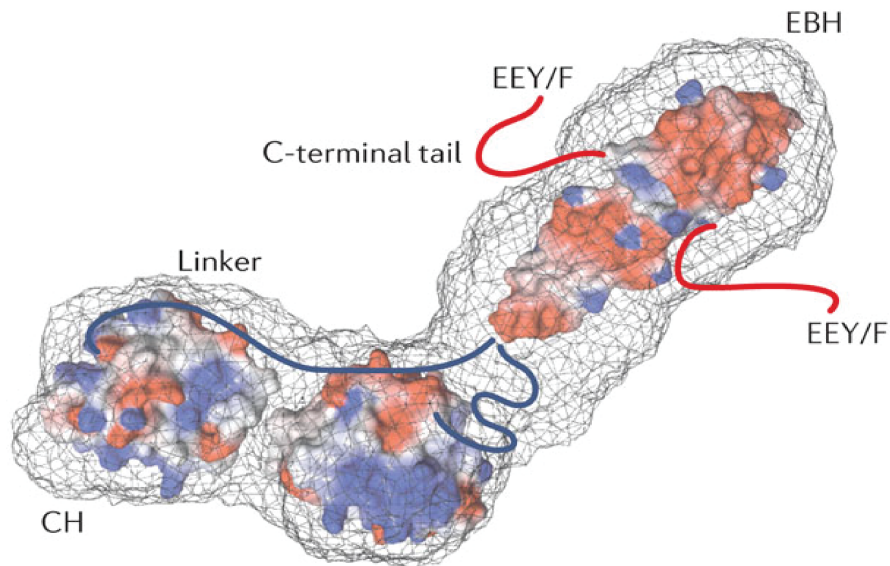


FIGURE 2.7 – **Structure d'un dimère de protéine EB**

La structure cristallographique du domaine CH positivement chargé est indiqué en bleu et le domaine carboxy-terminal négativement chargé en rouge (hayashi 2003). l'enveloppe grise dans laquelle sont regroupés les domaines a été obtenue small-angle X-ray scattering (buey 2011). La région variable ainsi que les motif EEY/F sont représentés par des lignes et la couleur représente leur charge electrostatique (akhmanova steinmetz nature review2015)

Des études de microscopies ont révélées qu'un peu plus d'une centaine de protéines EBs se liait à la région croissante des microtubules, où elles s'accumulent sous forme de comètes longues de $0.5-2\mu\text{m}$ (Bieling et al., 2007; Seetapun et al., 2012; Mimori-Kiyosue et al., 2000).

Les études *in vitro* ont démontré que les protéines EBs sont des +TIPs autonomes pouvant s'accumuler les extrémités croissantes (Bieling et al., 2008; Dixit et al., 2009). La préférence des proteines EBs pour l'extrémité "+" est basée sur le fait qu'*in vivo* l'extrémité "-" ne croit pas.

APC, Adematous Polyposis Coli

APC est une protéine à plusieurs domaines contenant des sites de liaisons à de nombreuses protéines, incluant les tubulines, les filaments intermédiaires, des régulateurs du cytosquelette comme EB1 et IQGAP1, les composants de la voie de signalisation Wnt comme

la β -catenine et l'axine, et le GEF Asef. APC est impliquée dans la régulation de nombreux processus cellulaire (Figure 2.8)

APC est observée à l'extrémité positive des microtubules (Näthke et al., 1996) auquel elle peut se lier et la stabiliser (Munemitsu et al., 1994). De nombreuses études ont démontré qu'APC régule le réseau de microtubules et joue un rôle dans les processus dépendants des microtubules comme la migration cellulaire et la formation du fuseau mitotique (Näthke, 2004, 2006). En effet, la déplétion d'APC semble inhiber la formation de la protrusion cellulaire ainsi que la migration (Kroboth et al., 2007). La déplétion d'APC semble aussi diminuer la stabilité des microtubules et leur niveau de modification post-traductionnelles à l'avant de la protrusion (Kroboth et al., 2007).

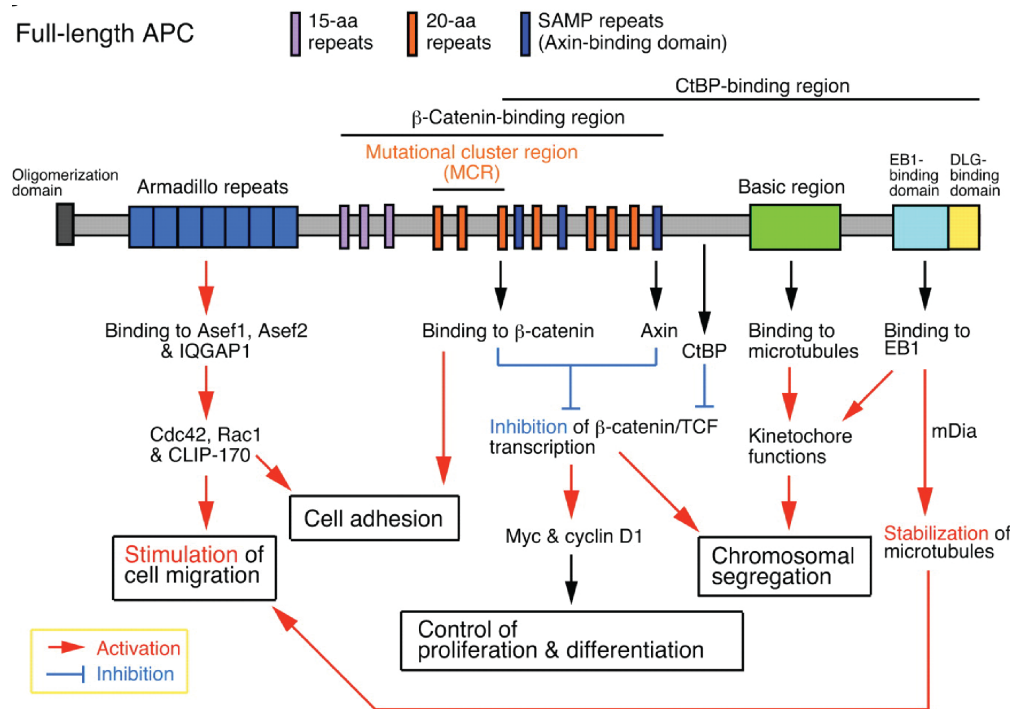


FIGURE 2.8 – Les différents domaines et fonctions d'APC

Diagramme représentant les différents domaines composants APC ainsi que leur fonctions associées. APC stimule la migration cellulaire via ses interactions avec Asef, IQGAP1 et mDia. APC est aussi impliquée dans la régulation de l'adhésion cellulaire via le contrôle de la distribution de beta-catenine entre le noyau et le cytoplasme. APC inhibe la transcription de beta-catenin/TCF via ses interactions avec la beta catenine ou CtBP. APC régule aussi la séparation des chromosomes via son interaction avec les kinétochores et via l'inhibition de la voie de signalisation Wnt. Les flèches rouges indiquent une activation et les flèches bleues, une inhibition. (Aoki and Taketo, 2007)

La contribution d'APC dans la stabilisation et la polymérisation des microtubules est due son interaction avec EB1 (Morrison et al., 1998; Nakamura et al., 2001). De nombreuses études ont indiqué que la fonction d'EB1 et APC dans la régulation du réseau de microtubules s'effectue sous contrôle de Rho et mDia (Wen et al., 2004).

Dans les astrocytes, la phosphorylation de GSK3 β par Cdc42 au front de migration induit l'interaction d'APC avec l'extrémité "+" des microtubules. L'association d'APC avec les microtubules est essentielle dans la mise en place de la polarité cellulaire (Etienne-Manneville and Hall, 2003). APC régule la dynamique des réseaux d'actine, de microtubules (Etienne-Manneville, 2009) mais aussi l'organisation du réseau de vimentine dans différents types cellulaires incluant les astrocytes (Sakamoto et al., 2013) (Figure 2.9).

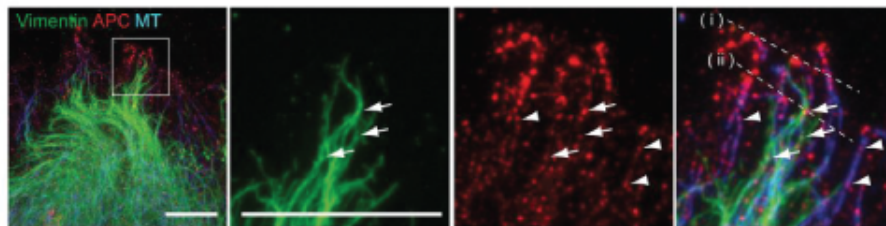


FIGURE 2.9 – Localisation d'APC dans les astrocytes

Images d'immunofluorescence indiquant la vimentine, APC et les microtubules dans les astrocytes en migration. Le zoom (carré blanc image de gauche) à droite montre APC le long des microtubules (flèches blanches). On peut observer une colocalisation d'APC avec la vimentine (Sakamoto et al., 2013)

CLIPs et CLASPs Les protéines CLASPs (cytoplasmic linker protein (CLIP)-associated proteins) sont une classe de +TIPs qui peuvent se lier au réseau de microtubules et recruter des dimères de tubuline solubles (Al-Bassam et al., 2010). Il semblerait aussi que les CLASPs puissent affecter le réseau de microtubules, probablement en facilitant l'hydrolyse du GTP (Grimaldi et al., 2014). Les CLASPs augmentent aussi la densité et la stabilité du réseau de microtubules dans différents types cellulaires chez les animaux, les plantes et les champignons (Galjart, 2005).

2.3 Régulation de la fonction des microtubules : le "code" tubuline

La structure des microtubules ainsi que les séquences génomiques des dimères d' α - et β -tubuline ont été hautement conservées durant l'évolution. De ce fait, il existe peu de variation entre les microtubules de chaque espèce. Malgré cette conservation évolutive, les microtubules sont des structures adaptées à de diverses fonctions cellulaires. Deux mécanismes peuvent générer cette diversité fonctionnelle : tout d'abord l'expression de différents gènes codant pour des isotypes de l' α - et la β -tubuline et la génération de multiples modifications post-traductionnelles (figure 2.10 et 2.11). Certains isotypes sont spécifiquement exprimés dans certains tissus et cellules et l'expression de ces isotypes peut varier durant le développement (Lewis et al., 1987) (Denoulet et al., 1986).

2.3.1 Les isotypes de tubuline

Le premier clonage des gènes codant pour la tubuline effectué dans les années 70 (Cleveland et al., 1978) a permis de révéler la présence de différents gènes (Sullivan, 1988) codant pour les deux sous-unités de la tubuline (Ludueña and Banerjee, 2008) induisant des différences dans la séquence d'acides aminés des monomères et notamment au niveau de la queue C-terminale (Figure 2.10).

Différents isotypes peuvent avoir des fonctions spécifiques, ainsi un isotype particulier ne peut pas nécessairement être remplacé par un autre (Nielsen et al., 2001). Par exemple, la β -tubuline divergente observée dans les plaquettes est localisée spécifiquement à la périphérie et est essentielle dans le maintien de leur forme sphérique (Schwer et al., 2001).

L'effet de la composition en isotype sur l'assemblage et la dynamique des microtubules n'est pas encore connu. Certaines études suggèrent que le taux d'isotype pourrait moduler la dynamique des microtubules (?Panda et al., 1994; Newton et al., 2002) et que les MAPs pourraient différemment interagir avec les différents isotypes (Lu et al., 2004).

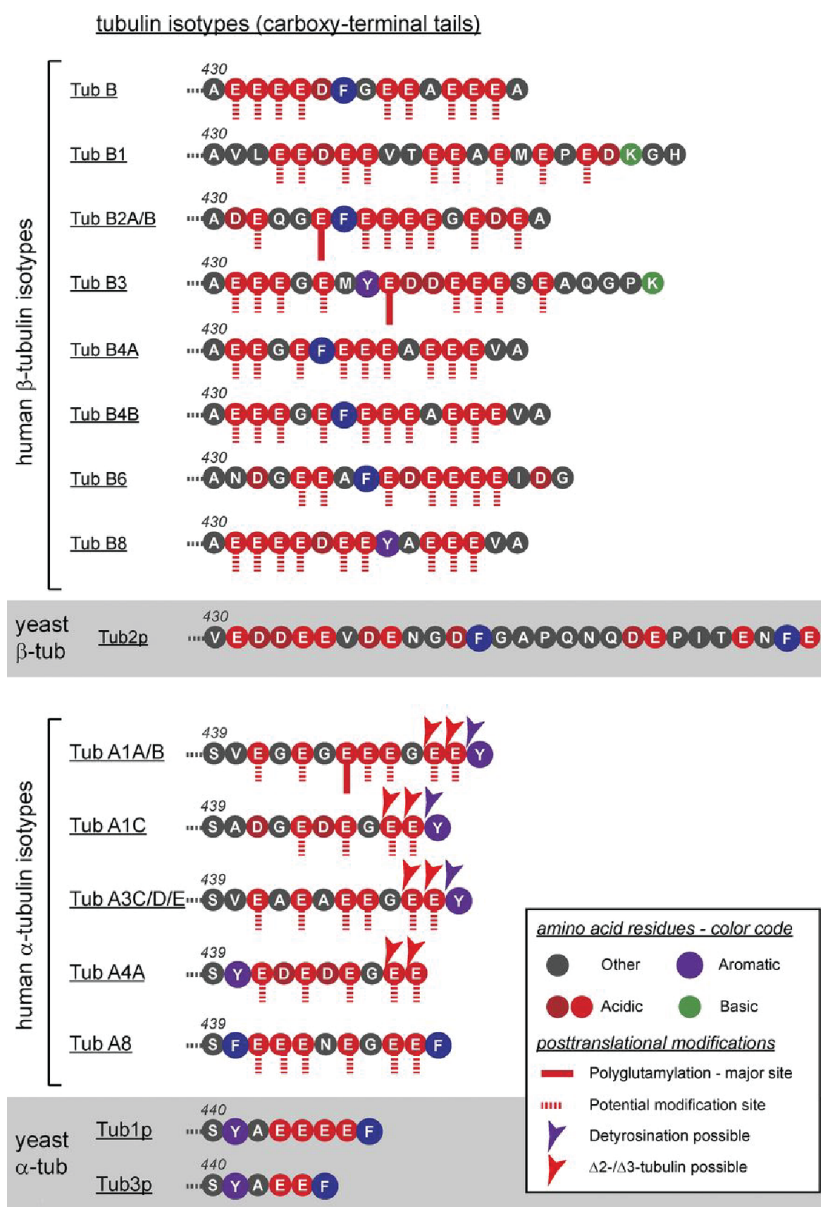


FIGURE 2.10 – Les différents isotypes de tubuline α - et β humaine et les modifications post-traductionnelles associées à leur queue C-terminale. Séquence d'acides aminés des queue carboxy terminales des différents isotypes de tubuline. Les acides aminés sont indiqués par des lettres et le code couleur indique les propriétés biochimique de l'acide aminé correspondant. La tubuline bactérienne présentée est celle de *Saccharomyces cerevisiae* (Janke, 2014).

2.3.2 Les modifications post-traductionnelles des microtubules

Il existe deux types de modifications post-traductionnelles (PTMs) de la tubuline : les polymodifications telles que la polyglutamylation et

la polyglutamylation ainsi que les monomodifications comme l'acétylation, la détyrosination et la phosphorylation (Figure 2.11) (Song and Brady, 2015; Yu et al., 2015). Je vais détailler tout d'abord la polyglutamylatation, polymodification que j'ai étudiée durant mon stage de master au laboratoire et au début de ma thèse, puis j'aborderai la détyrosination et l'acétylation que j'ai étudiée par la suite.

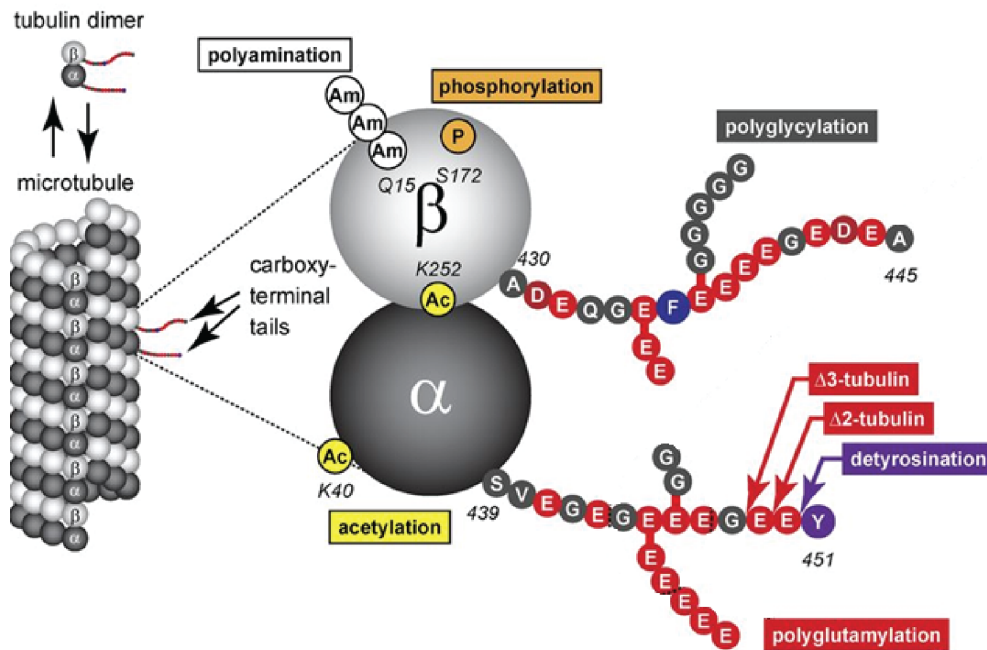


FIGURE 2.11 – Représentation schématique du dimère d' α - et β -tubuline et les modifications post-traductionnelles qui lui sont associées. Les monomodifications telles que l'acétylation (Ac), la phosphorylation (P) et la polyamination (Am) se situent sur la structure principale de la tubuline tandis que la polyglutamylatation, polyglycylation et détyrosination s'effectuent au niveau de la queue C-terminale. D'après (Janke, 2014)

La polyglutamylatation, une polymodification

Les polymodifications comme la polyglutamylatation et la polyglycylation consistent en la génération de chaînes latérales composées respectivement de résidus glutamate ou glycine au niveau de la queue carboxy-terminale de l' α - et la β -tubuline.

La polyglycylation a été initialement observée chez l'organisme *Paramecium tetraurelia* (Redeker et al., 1994).

Je développerai uniquement la polyglutamylatation, dont le principe

est similaire à la polyglycylation et sur laquelle j'ai travaillé durant mon master et au début de ma thèse.

Mécanisme La polyglutamylation est l'ajout réversible de chaînes latérales de glutamate sur la queue carboxy-terminale de la tubuline. La longueur des chaînes latérales peut varier de 1 à 20 unités de glutamate permettant ainsi de générer divers signaux à partir d'un site unique de modification (figure 2.12).

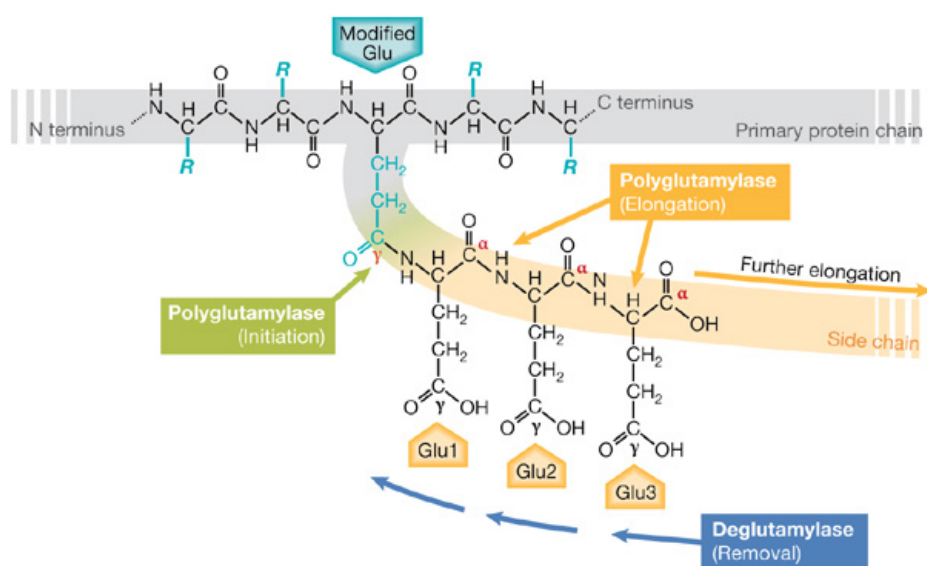


FIGURE 2.12 – Mécanisme de polyglutamylation

La polyglutamylation s'effectue au niveau d'un glutamate modifié de la séquence primaire de la protéine (modified Glu). La première étape est l'initiation durant laquelle un pont amide est créé entre le groupement carboxyle γ du glutamate modifié et le groupement amine d'un glutamate (Glu1). Ensuite, la séquence de glutamate s'allonge : c'est la phase d'élongation (en orange). D'après (Janke and Chloë Bulinski, 2011)

Les chaînes latérales de glutamate sont synthétisées en deux étapes distinctes. La première étape, l'initiation, consiste en l'ajout d'un résidu glutamate par formation d'une liaison covalente entre le groupement amine et le groupement carboxyle γ d'un résidu glutamate modifié situé à l'extrémité C-terminale de la tubuline. Les réactions suivantes d'élongation sont responsables de la formation des chaînes latérales de glutamate. Bien que les carboxyles α et γ de l'unité glutamate des chaînes latérales soient tous les deux disponibles pour l'élongation, les

nouveaux glutamates sont liés principalement aux groupes carboxyles α de l'unité glutamate précédente (Figure 2.12).

Les enzymes impliquées dans la polyglutamylation

Les (poly)glutamylases : Tubuline tyrosine ligase-like (TTLLs) Les enzymes qui catalysent la formation des chaînes latérales de glutamate et glycine font partie de la famille des Tubuline Tyrosine Ligase-Like (TTLLs). L'alignement des séquences génomiques des TTLLs indique la présence d'une séquence conservée correspondant au domaine catalytique des Tubuline Tyrosine Ligases (TTLs). Ces enzymes sont conservées chez de nombreux eucaryotes mais absentes chez les champignons et les plantes supérieures suggérant une co-évolution de ces enzymes avec les cils, les centrioles et le corps basal.

Il existe 7 TTLLs impliquées dans la polyglutamylation. Celles-ci possèdent une spécificité de substrat entre l' α - et la β -tubuline augmentant la complexité des signaux que la polyglutamylation peut générer sur les microtubules. De plus, certaines glutamylases ont une activité initiatrice (TTLL1, 4, 5 et 7) tandis que d'autres ont une activité élongatrice (TTLL11 et 13) (Figure 2.13.B)). Certaines TTLLs peuvent aussi modifier d'autres protéines cytoplasmiques ou nucléaires (Van Dijk et al., 2008).

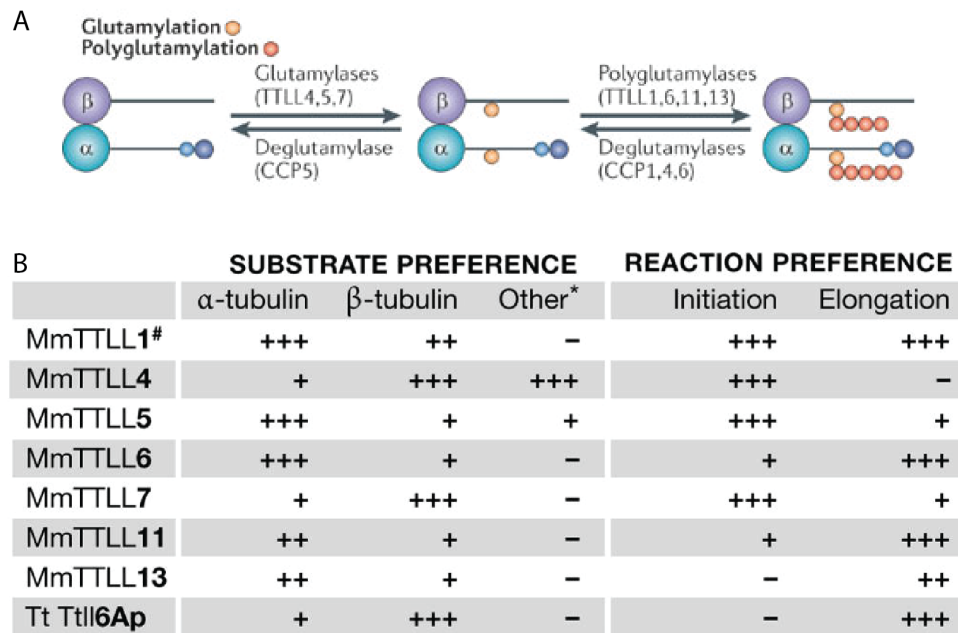


FIGURE 2.13 – Les enzymes catalysant la polyglutamylaton et la déglutamylaton

A. La polyglutamylaton s'effectue sur le microtubule polymérisé tandis que la réaction inverse s'effectue sur le dimère soluble. TLL : Tubulin-tyrosin ligase like ; CCP : Cytosolic carboxypeptidase. D'après (Janke and Chloë Bulinski, 2011). **B.** Les TLLs possèdent une spécificité de réaction et de substrat (Janke et al., 2008)

Les déglutamylases : les carboxypeptidases La polyglutamylaton est une réaction enzymatique réversible. Les enzymes qui catalysent la suppression d'un ou plusieurs résidus glutamate sont les carboxypeptidases (Kimura et al., 2010; Rogowski et al., 2010) (Figure 2.13.A).

Localisation cellulaire et subcellulaire de la polyglutamylaton La polyglutamylaton est abondante dans les neurones, où la majeure partie de la tubuline α - et β portent sur des chaînes latérales de 1 à 6 résidus glutamate (Audebert et al., 1994). Les chaînes les plus longues sont retrouvées sur les microtubules des axonèmes dans les cils et les flagelles (Kierszenbaum, 2002; Million et al., 1999; Wloga et al., 2016), mais aussi sur les centrioles, composants des centrosomes, et sur le corps basal (Bobinnec et al., 1998) (Figure 2.14).

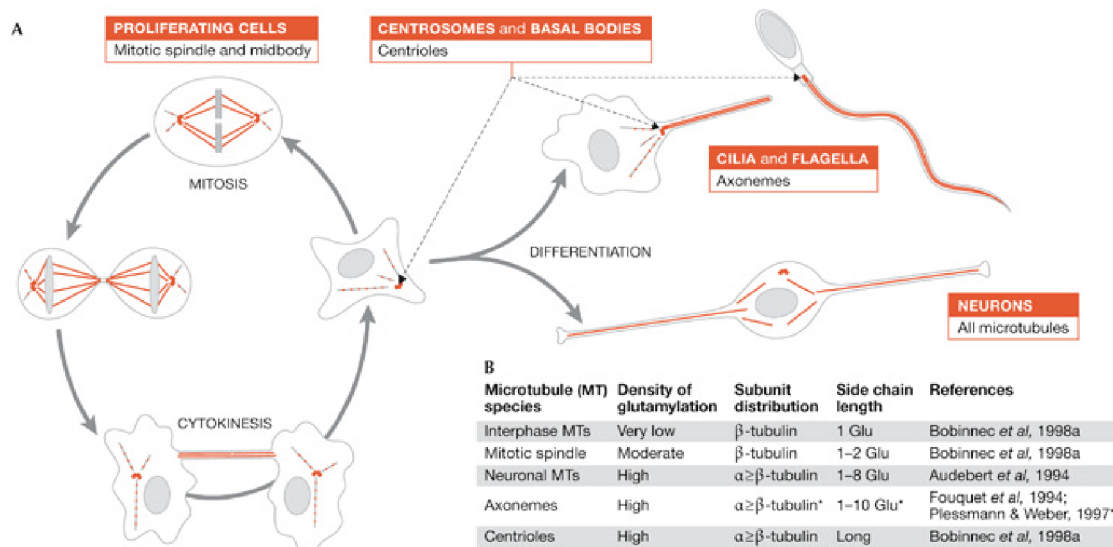


FIGURE 2.14 – localisation cellulaire et subcellulaire de la polyglutamylat-ion

A. Représentation schématique des microtubules polyglutamylés dans les cellules de mammifères. Dans les cellules en interphase, les microtubules cytoplasmiques sont faiblement polyglutamylés en interphase. Durant la division cellulaire, le niveau de polyglutamylation augmente au niveau du fuseau mitotique. Les microtubules des neurones ainsi que les structure comme les centrioles et les axonèmes sont fortement polyglutamylés. **B.** Le tableau représentent le taux de polyglutamylation observé ainsi que la taille approximative de la chaîne latérale de glutamate. D’après (Janke and Chloë Bulinski, 2011)

Fonctions potentielles de la polyglutamylation

Modulation des interactions avec les MAPs et les moteurs moléculaires

La polyglutamylation modulerait les interactions des microtubules avec leur protéines associées et les moteurs moléculaires en augmentant par exemple le nombre de charges négatives au niveau de la queue C-terminale. Le niveau de polyglutamylation affecte par exemple l’interaction de MAP1 et MAP2 avec la tubuline (Bonnet *et al.*, 2001) et augmente le clivage des microtubules par la spastin (Lacroix *et al.*, 2010).

L’effet de la polyglutamylation sur les moteurs moléculaires n’est pas totalement résolu. Il a été observé que la diminution du niveau de polyglutamylation dans le cerveau altère la distribution de la kinesine 3 mais pas de la kinesine 1 (Ikegami *et al.*, 2007). Alors que

l'augmentation du niveau de polyglutamylolation suite à l'inhibition de l'activité synaptique est corrélée avec une inhibition de la motilité de la kinesine 1 mais pas de la kinesine 3 (Maas et al., 2009). Ces résultats suggèrent que des changements locaux du niveau de polyglutamylolation permettraient la sélection de certains cargos synaptiques (Maas et al., 2009).

Cependant, d'autres études *in vitro* de la motilité de la kinesine et de la dyneine indiquent que l'addition de glutamate sur la queue c-terminale de la tubuline $\beta 3$ affecte l'activité des kinesines et dyneines (Sirajuddin et al., 2014).

Rôle de polyglutamylolation dans la dégénération neuronale CCP1 est sur-exprimée durant le développement et la régénération neuronale suggérant un rôle de la polyglutamylolation dans la croissance des neurites (Harris et al., 2000). La souris *pcd* qui résulte de la perte de fonction de CCP1 présente une dégénération des cellules de Purkinje et une augmentation de la polyglutamylolation de la tubuline chez l'adulte (Rogowski et al., 2010). Dans ce modèle, la suppression de TTL1 protège les cellules purkinje de la dégénération (Rogowski et al., 2010; Berezniuk et al., 2012).

Rôle de la polyglutamylolation dans le maintien des cils et flagelles Certaines études suggèrent que la polyglutamylolation est impliquée dans la dynamique des microtubules. Par exemple, TTL6p stabiliserait les microtubules cytoplasmiques tout en déstabilisant ceux des axonèmes chez *Tetrahymena* (Wloga and Gaertig, 2010). La polyglutamylolation est impliquée dans le contrôle de la formation et de la fonction du cil. La protéine adaptatrice PGs1 est nécessaire pour localiser le complexe polyglutamylase au niveau des MTs dans les cils et les neurones (Regnard et al., 2003) et la suppression de PGs1 chez la souris réduit de manière significative le taux de polyglutamylolation (Ikegami et al., 2007). La souris est viable mais présente des défauts de motilité des spermatozoïdes, des modifications du comportement (Campbell et al., 2002) et une altération de la composition et fonction synaptique (Ikegami et al., 2007).

La tyrosination/détyrosination

Ce fut la première modification post-traductionnelle de la tubuline observée (Barra et al., 1973)

Mécanisme On observe un résidu tyrosine à l'extrémité de la queue C-terminale de la majorité des isotypes de la tubuline α à l'exception de la TUBA4A possédant un résidu glutamate terminal et la TUBA8 une phénylalanine (Figure 2.15). Le produit de la détyrosination est connu sous le nom de "Glu-tubuline" puisque l'avant dernier résidu de la queue C-terminale de la tubuline est un glutamate.

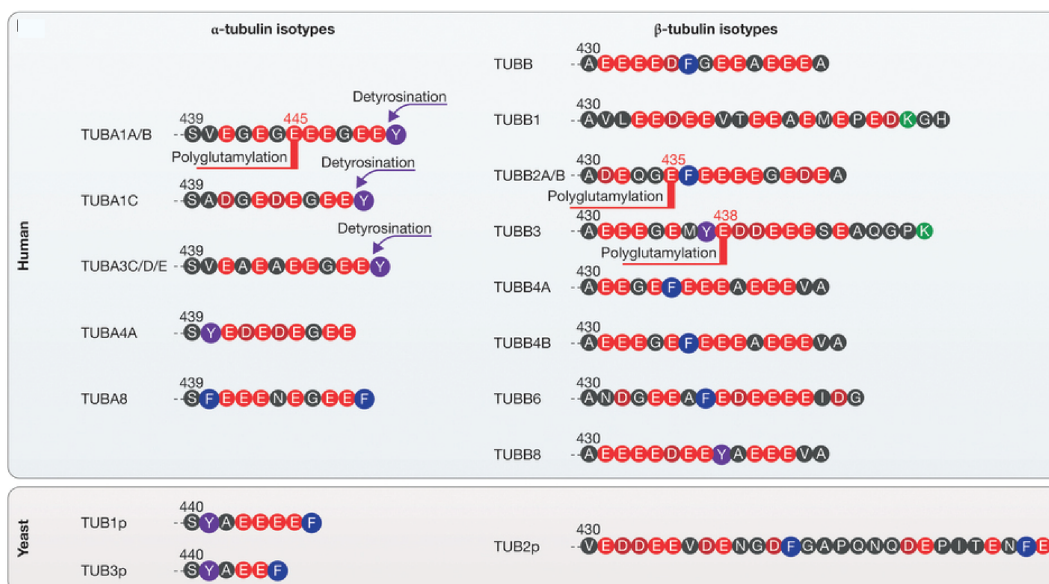


FIGURE 2.15 – Diversité des queues carboxy-terminale de la tubuline
 Comparaison des queues carboxy-terminale des sous-unité α et β de la tubuline chez l'humain et la levure (*S. cerevisiae*) en fonction des isotypes. Wehenkel and Janke (2014)

Les enzymes Malgré la caractérisation biochimique de l'activité de détyrosination (Hallak et al., 1977), la carboxypeptidase catalysant la détyrosination de l' α tubuline n'a pas été encore identifiée. Mais l'enzyme catalysant la réaction inverse, la tyrosination a été identifiée comme étant la tubuline tyrosine ligase (TTL) (Raybin and Flavin, 1975; Deanin and Gordon, 1976; Argarana et al., 1980) (Figure 2.16). La TTL modifie spécifiquement les dimères de tubuline non polymérisés

tandis que la détyrosinase non identifiée semble agir préférentiellement sur les microtubules polymérisés (Kumar and Flavin, 1981; Arce and Barra, 1983) modifiant ainsi une population spécifique de microtubules dans les cellules (Gundersen et al., 1987). L'interaction de TTL avec le dimère de tubuline interfère avec la polymérisation, en effet la sur-expression de TTL inhibe la polymérisation des microtubules *in vivo* (Szyk et al., 2011).

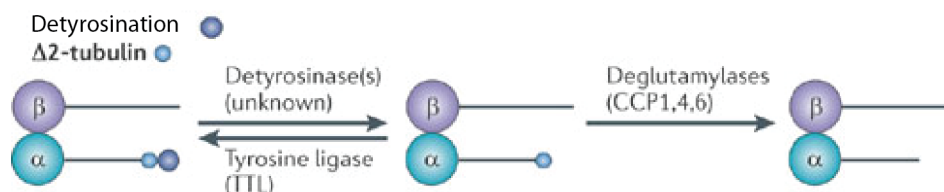


FIGURE 2.16 – **Les enzymes impliquées dans tyrosination/detyrosination**
La détyrosination s'effectue sur le microtubule polymérisé tandis que la réaction inverse s'effectue sur le dimère soluble. TTL : Tubulin tyrosin ligase ; CCP : Cytosolic carboxypeptidase. D'après (Janke and Chloë Bulinski, 2011)

Fonctions potentielles de la detyrosination

La détyrosination, un marqueur de stabilité des microtubules ? Cette modification étant principalement observée au niveau de microtubules âgés, dits "stables", possédant une faible dynamique (demi-vie de 16h) tandis que la tubuline tyrosinée est observée principalement au niveau des microtubules dynamique (demi-vie de 3-5 min) (Webster et al., 1987). Elle est abondante dans les neurones (Cambray-Deakin and Burgoyne, 1987a; Robson and Burgoyne, 1989), il a été suggéré que la détyrosination pourrait induire une stabilité des microtubules (Gundersen et al., 1987; Sherwin et al., 1987). Des études récentes ont démontré que la différence de stabilité entre la Tyr- et la Glu-tubuline serait due à un recrutement différentiel de régulateurs de la dynamique des microtubules et à un changement intrinsèque des propriétés du polymère (Peris et al., 2009).

Le rôle de détyrosination dans la régulation des moteurs moléculaires
De nombreuses études ont montré que la tyrosine présente au niveau de la queue C-terminale de la tubuline agirait tel un signal on/off pour

le recrutement de régulateurs de la dynamique des microtubules. Par exemple, la kinésine-13 MCAK dépolymériserait préférentiellement les microtubules tyrosinés (Peris et al., 2009). Hormis les moteurs kinésine-13, les protéines localisées à l'extrémité positive des microtubules possédant des domaines CAP-gly, comme clip170 ou p150/glued, interagissent spécifiquement avec les microtubules tyrosinés (Peris et al., 2006a; Bieling et al., 2008). Chez *Saccharomyces cerevisiae*, les deux isoformes de la tubuline α présents ne possèdent pas de tyrosine au niveau de leur queue C-terminale, et l'orthologue bactérien de CLIP170 (Bik1p) est incapable de s'accumuler à l'extrémité "+" croissante des microtubules (Badin-Larçon et al., 2004). A l'inverse, la kinésine 1 semble interagir préférentiellement sur les microtubules détyrosinés (Liao and Gundersen, 1998).

Les microtubules riches en tubuline détyrosinée sont majoritaires à l'avant des cellules en migration, ainsi l'interaction préférentielle de certaines kinésines pour des microtubules détyrosinés induirait une distribution asymétrique des cargos au front de migration (Gundersen and Bulinski, 1988).

La détyrosination est impliquée dans des défauts du système nerveux
La plupart des organismes ne possède qu'un unique gène codant pour la TTL. Ainsi, chez la souris dépourvue de TTL on observe une importante accumulation de tubulines détyrosinées et plus particulièrement de tubuline $\delta 2$. Ces souris meurent 24h après la naissance (Erck et al., 2005) avec d'importants défauts du système nerveux liés à des problèmes de différenciation neuronale (Marcos et al., 2009). TTL étant spécifique de la tubuline (Prota et al., 2013), les défauts observés dans cette souris sont directement imputables de la dérégulation du cytosquelette de microtubules. De plus, chez ces souris n'exprimant pas TTL, les cônes de croissance et les extensions neuronales sont dépourvues de CLIP170 à leur extrémité "+" et les fibroblastes présentent une morphologie anormale ainsi que des défauts de positionnement du fuseau mitotique (Peris et al., 2006b).

La $\Delta 2$ tubuline

La suppression de la tyrosine en position terminale révèle un glutamate. Celui-ci peut être clivé (Janke and Kneussel, 2010). Cette modification est appelée tubuline $\Delta 2$ en référence aux deux acides aminés manquants de la queue C-terminale (Figure 2.15).

Une étude biochimique de la tubuline de cerveau a révélé qu'environ 35% de l' α -tubuline ne peut pas être re-tyrosinée (Paturle et al., 1989) en raison de l'absence de l'avant dernier résidu glutamate au niveau de la queue C-terminale (Paturle-Lafanechère et al., 1991). Il semblerait que cette modification maintienne la tubuline dans un état détyrosiné.

Les enzymes impliquées dans cette modification sont membres de la famille des carboxypeptidases cytosoliques (CCPs) (Kalinina et al., 2007; Rodriguez de la Vega et al., 2007) dont la plupart d'entre elles catalysent la déglutamylation en supprimant le résidu glutamate terminal ou en réduisant la longueur des chaînes latérales de glutamates (Rogowski et al., 2010). Ces enzymes sont aussi capables de générer des motifs $\Delta 3$ (Berezniuk et al., 2012) suggérant que la dégradation de la queue terminale de la tubuline est possible, mais son rôle n'a pas été identifié.

Le motif $\Delta 2$ est principalement observé au niveau des microtubules ayant une longue demi-vie, chez les neurones, dans les centrioles, axonèmes des cils et flagelles mais aussi dans les microtubules stabilisés par ajout de taxol (Paturle-Lafanechère et al., 1994). Pour former un motif $\Delta 2$, il faut tout d'abord une détyrosination de l' α -tubuline dont le taux est régulé par la balance entre les niveaux de détyrosination et de tyrosination. Ce lien entre ces deux modifications est observable chez la souris dépourvue en TTL qui possède un taux élevé de tubuline $\Delta 2$ (Erck et al., 2005).

Les autres modifications de la tubuline

- la polyamination qui consiste en l'ajout covalent d'un polyamine catalysé par une transglutaminase (TG). Les microtubules axonaux des neurones matures sont très stables, (Song et al., 2013). Ils contiennent des sous unités de tubuline plus basiques que normalement prédit par les séquences (Brady et al., 1984), suggérant

la présence d'une modification post-traductionnelle qui augmente la quantité de charges positives (Figure 2.17),

- la phosphorylation, initialement observée sur la sous unité β de la tubuline de cellules de neuroblastomes différenciées (Gard and Kirschner, 1985). Par la suite, il a été démontré que les deux sous-unité peuvent être modifiée par de nombreuses kinases (Wloga and Gaertig, 2010) (Figure 2.17),
- la glycosylation,
- l'ubiquitinylation et la sumoylation, sont l'ajout covalent de deux petites protéines (Flotho and Melchior, 2013),
- la palmitoylation pouvant affecter l'interaction avec les membranes et le trafic subcellulaire (Fukata and Fukata, 2010)

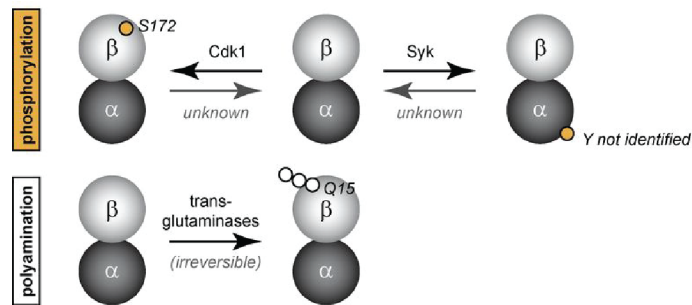


FIGURE 2.17 – **Les autres modifications post-traductionnelles de la tubuline**
Schéma représentant la phosphorylation (en jaune) et la polyamination (en blanc).
CDK1, cyclin-dependent kinase 1 (Janke and Chloë Bulinski, 2011)

L'acétylation de la lysine 40 de la sous-unité α de la tubuline

Découverte et mécanisme En premier lieu, il été observé que l'acétylation du groupe amine ϵ des résidus lysine de la tubuline en présence d'un anhydride acétique inhibe à la fois la polymérisation de la tubuline et la formation d'un complexe stable avec la colchicine (Dasgupta et al., 1983). Par la suite l'acétylation a été observée au niveau de la tubuline α flagellaire de *Chlamydomonas reinhardtii*, acétylée durant l'assemblage des microtubules au sein du flagelle. L'incubation de cellules déflagellées dans un milieu contenant de l'acétate a permis de démontrer qu'une seule lysine de la sous-unité α de la tubuline était acétylée (L'Hernault and Rosenbaum, 1983, 1985).

Contrairement aux autres modifications post-traductionnelles, qui décorent soit la queue C-terminale de la tubuline soit la face externe du microtubule, l'acétylation se situe au niveau de la lysine 40 de la tubuline α (L'Hernault and Rosenbaum, 1985), résidu situé dans une zone particulièrement désordonnée et prédite pour être localisée sur la surface luminale des microtubules (Soppina et al., 2012a; Nogales et al., 1998a)(Figure 2.18).

Depuis, d'autres sites d'acétylation ont été caractérisés sur la tubuline α et β . Une étude de la totalité de l'acétylome a permis d'identifier plus de 10 nouveaux sites localisés sur la tubuline α - et β (Choudhary et al., 2009) dont un a été décrit au niveau de la lysine 252 de la sous unité β et est catalysé par l'acetyltransferase San. Cette acétylation régulerait l'efficacité d'assemblage des microtubules de par sa localisation à l'interface de polymérisation (Chu et al., 2011).

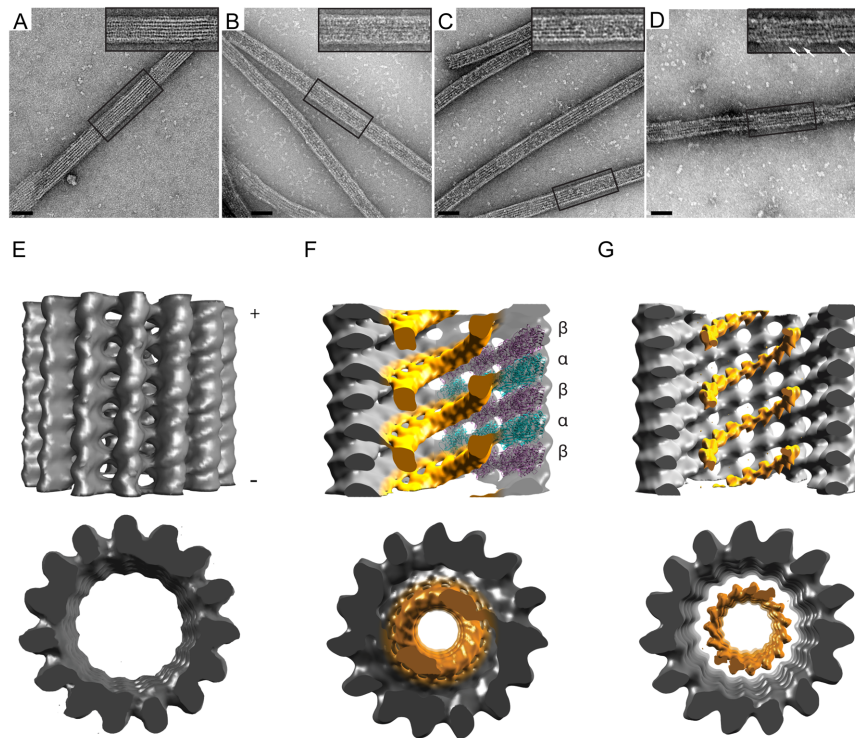


FIGURE 2.18 – Localisation de l'acétylation de la lysine 40 de la tubuline α sur la surface lumineuse des microtubules

A. Point de départ de la polymérisation des microtubules. **D.** non traités. **B.** Traités par ajout de MEC-17 (acétylés). **C.** Traités avec SIRT2 (désacétylés). La tubuline a été incubée en A à C avec des fragments d'anticorps 6-11B-1 ou en D avec le domaine moteur de la chaîne lourde de la kinésine 1 fusionnée à la GST. Les flèches blanches en D indiquent les kinésines 1 présentes sur la surface des microtubules. Barre d'échelle, $50\mu\text{m}$. **E-G.** Vue latérale et vue de l'extrémité "-" de reconstitutions hélicoïdales en 3 dimensions de microtubules vitrifiés. **E** Microtubule contrôle sans marquage acétyl. **F** Microtubule acétylé (en orange). **G** Microtubule désacétylé. (Soppina et al., 2012b)

Les enzymes régulant le niveau d'acétylation des microtubules Comme pour les autres modifications post-traductionnelles, le contrôle du niveau d'acétylation est soumis à la régulation de l'activité catalytique de certaines enzymes (les acetyl-transférases et les dé-acetylases) (Figure 2.19).

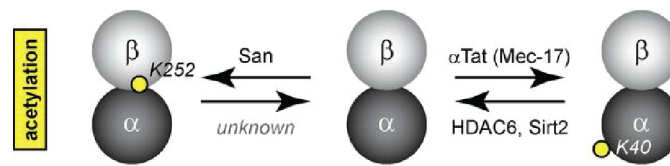


FIGURE 2.19 – **Les enzymes impliquées dans l’acétylation des microtubules**
L’acétylation s’effectue sur le microtubule polymérisé tandis que la réaction inverse s’effectue sur le dimère soluble. α TAT1, HDAC6 : Histone deacetylase 6 ; Sirt2. D’après Janke and Chloë Bulinski (2011)

Par analogie avec la détyrosination de la queue C-terminale de la tubuline, les enzymes impliquées dans l’acétylation de la tubuline ont une affinité plus ou moins grande pour la tubuline à l’état soluble ou polymérisée (Maruta et al., 1986a). L’acétylation étant le plus souvent observée au niveau de la sous-population de microtubules stables, il a donc été communément accepté que les désacetylases agiraient préférentiellement sur la tubuline soluble et les acétyl-transférases sur les polymères stables. L’acétylation de la tubuline α flagellaire de *Chlamydomonas* a été décrite il y a 30 ans (L’Hernault and Rosenbaum, 1985), mais les enzymes qui contrôlent son acetylation/deacetylation n’ont été identifiées que récemment (Akella et al., 2010; Shida et al., 2010; Hubbert et al., 2002). De nombreuses enzymes peuvent acétyler la tubuline, comme par exemple ELP3, ARD1-NAT1 et GCN5 (Perdiz et al., 2011) mais l’acetyltransferase principale est α TAT1.

L’acétyl-transférase α TAT1 L’enzyme impliquée dans l’acétylation de la lysine 40 de la tubuline est α TAT1 (Figure 2.20) (Akella et al., 2010; Shida et al., 2010). Cette enzyme acétyle spécifiquement la lysine 40 de la sous-unité α de la tubuline *in vitro* (Akella et al., 2010), ce qui en fait un excellent outil pour étudier spécifiquement le rôle de l’acétylation. Le substrat spécifique de cet enzyme, la lysine 40 de la sous unité α de la tubuline, est hautement conservé chez les mammifères (à l’exception de l’isotype TUBA8 humain). La suppression du gène codant pour α TAT1 dans la souris permet une déplétion totale de l’acétylation de la lysine 40 de l’ α -tubuline.

Dans les cellules en migration, α Tat1 est recrutée au niveau des microtubules au front de migration, par les puits de clathrine, via une

interaction avec AP2, induisant une localisation restreinte de l'acétylation au niveau de ces microtubules (Montagnac et al., 2013). Une déficience en α TAT1 induirait aussi une perturbation de la migration des neurones corticaux (Li et al., 2012b).

L'étude structurale récente d' α Tat1 a démontré que la faible activité catalytique de cette enzyme, couplée à sa localisation à l'intérieure des microtubules permettrait une acétylation sélective des microtubules ayant un longue demi-vie et stables (Szyk et al., 2014), ce qui expliquerait le lien entre cette modification post-traductionnelle et la stabilité des microtubules au sein de la cellule. Cependant, la fonction directe de l'acétylation de la lysine 40 de la tubuline sur les microtubules n'a pas été élucidée.

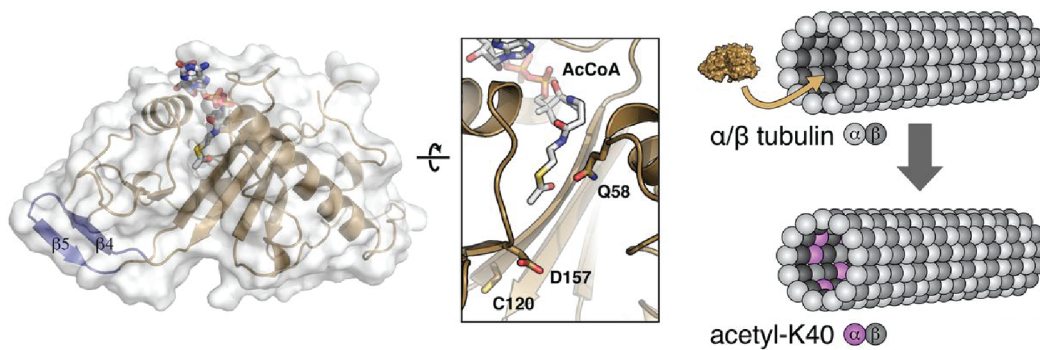


FIGURE 2.20 – Structure d' α TAT1

Vue détaillée du site catalytique de l'enzyme ou l'on peut voir le co-facteur AcCoA et les résidus catalytique Q58, C120 et D157. D'après (Al-Bassam and Corbett, 2012)

Le mecanisme d'action d' α TAT1 est toujours débattu. Des études ont montré que l'acétylation *in vitro* de l'axonème s'effectuait depuis les extrémité suggérant que l'enzyme diffuserait le long du lumen des microtubules (Akella et al., 2010; Ly et al., 2016; Coombes et al., 2016) (Figure 2.20). Mais les premières études ont démontré que l'acétylation s'effectuait indépendamment de la longueur des microtubules, ce qui suggèrerait un diffusion de l'enzyme à travers le lumen (Maruta et al., 1986b). Il a aussi été proposé que l'acetyltransferase puisse avoir accès à la lysine 40 via des cassures transitoires du filament (Shida et al., 2010). Enfin une étude structurale récente d' α TAT1 a démontré que l'enzyme posséderait une activité catalytique faible et serait présente à l'intérieur des microtubules (Szyk et al., 2014). D'autres études structurales ont

aussi montré qu' α TAT1 peut interagir avec la surface des microtubules *in vitro*, indépendamment de son niveau d'acétylation (Howes et al., 2014).

Les désacétylases HDAC6 et Sirt2 La désacétylation de la lysine 40 de la tubuline est catalysée par HDAC6 (histone deacetylase family member 6 (Hubbert et al., 2002) et Sirt2 (Sirtuin type 2;(North et al., 2003)).

HDAC6 est majoritairement cytoplasmique (Bertos et al., 2004), s'associe avec les microtubules. Elle désacétyle la tubuline α de microtubules pré-assemblés *in vitro* et au sein de la cellule (Hubbert et al., 2002; Zhang et al., 2003). Contrairement à ce qui était connu au sujet des modifications post-traductionnelles de la tubuline, HDAC6 ne désacétyle pas les dimères solubles de tubuline *in vitro* (Hubbert et al., 2002); et il a été montré que l'enzyme possède deux domaines catalytiques qui sont requis pour permettre son activité de désacétylase (Zou et al., 2006; Zhang et al., 2006).

L'activité d'HDAC6 peut être inhibée par des composants organiques tels que la trichostatin A (TSA) et spécifiquement par la tubacine, une drogue qui ne perturbe pas l'expression du gène ou la progression du cycle cellulaire (Haggarty et al., 2003). L'utilisation de la tubacine a permis de découvrir que certaines fonctions biologiques d'HDAC6 ne sont pas liées à son activité enzymatique. Par exemple, lorsque HDAC6 se lie à la protéine Tau, associée aux microtubules, elle n'est pas inhibée par la Tubacine, ce qui permet de contrôler la phosphorylation de Tau (Ding et al., 2008).

Les premières études fonctionnelles sur l'acétylation ont été effectuées en sur-exprimant, déplaçant ou inhibant chimiquement HDAC6 et Sirt2. Cependant ces deux enzymes désacétylent d'autres substrats. HDAC6 désacétyle Hsp90, une protéine chaperonne connue pour s'associer aux microtubules (Redmond et al., 1989; Bali et al., 2005), la cortactine (Zhang et al., 2007a) et à la tubuline soluble (Garnier et al., 1998). HDAC6 est aussi impliquée dans la régulation de la dynamique des microtubules dans les mélanomes (Zilberman et al., 2009). La surexpression de HDAC6 mutée au niveau de ses domaines catalytiques et son inhibition ont démontré que l'activité catalytique d'HDAC6

est requise pour permettre l'élongation et la dépolymérisation des microtubules. Cependant la déplétion de HDAC6 à l'effet inverse de la tubacine et augmente l'acétylation de la tubuline, mais cela n'affecte pas la dynamique des microtubules. Ces résultats suggèrent que la présence de l'enzyme, et pas seulement son activité catalytique, contribue au contrôle de la dynamique des microtubules (Matsuyama et al., 2002; Zilberman et al., 2009). Cette fonction régulatrice d'HDAC6 est encore débattue puisque certaines études ont démontré que l'inhibition de l'enzyme ou l'expression d'une forme mutée de la tubuline K40A ne modifieraient pas les paramètres d'instabilité dynamique des microtubules dans les neurones (Dompierre et al., 2007).

La seconde déacetylase de la tubuline qui a été identifiée est Sirt2, qui utilise NAD comme coenzyme (North et al., 2003). Comme HDAC6, elle est localisée au niveau du cytoplasme (North et al., 2003). Mais contrairement à celle-ci, Sirt2 désacétyle la tubuline à la fois soluble et polymérisée (North et al., 2003). Comme HDAC6, Sirt2 n'est pas spécifique de la tubuline et peut deacétyler d'autres substrats tels que le facteur de transcription FOXO1 (Wang and Tong, 2009) et p53 (Wang et al., 2015).

La lysine 40 de la sous-unité α de la tubuline Les acteurs moléculaires et régulateurs de l'acétylation de la sous-unité α de la tubuline sont connus, mais la manière dont le résidu lysine 40 est reconnu et ciblé par les acetylases et deacetylases soulève encore de nombreuses questions.

Les données obtenues sur la structure de la tubuline et les connaissances concernant les autres modifications post-traductionnelles, indiquent que la boucle contenant la lysine 40 devrait être exposée sur la surface interne des microtubules (Nogales et al., 1998a). Cette localisation du site d'acétylation de la tubuline soulève la question du mécanisme d'accès des enzymes régulatrices au lumen des microtubules et le mécanisme de sélection de ces enzymes entre les microtubules stables et dynamiques.

En observant le marquage obtenu avec l'anticorps spécifique de l'acétylation de la lysine 40, il a été proposé que certains défauts dans le maillage des microtubules induits par la fixation permettraient à l'anticorps d'accéder au lumen des microtubules (Odde, 1998). Ceci

expliquerait le marquage discontinu le long des microtubules (Webster and Borisy, 1989; Piperno et al., 1987). En effet dans des cellules non fixées perméabilisées et incubées avec l'anticorps, l'extrémité N-terminale de la tubuline (Dráber et al., 1989) et plus particulièrement la lysine 40 est accessible à l'anticorps (Dráberová et al., 2000). Le même résultat a été observé lorsque l'anticorps monoclonal 6-11B-1 a été micro-injecté (Dráberová et al., 2000). Cependant, la tubuline acétylée est immédiatement détectée après l'injection de l'anticorps 6-11B-1 et sans fixation des microtubules. Les défauts dans le maillage des microtubules sont détectés non seulement après fixation mais aussi dans des microtubules vitrifiés assemblés à partir de tubuline purifiée ou en présence de MAPs (??), suggérant qu'il pourrait exister des zones sensibles le long des microtubules qui permettraient le passage de la protéine à l'intérieur des microtubules.

Des études de microscopie électronique et de cryo-tomographie des microtubules cellulaires ont révélé la présence de certaines particules dans le lumen (Bouchet-Marquis et al., 2007) suggérant que l'intérieur des microtubules est accessible aux protéines ou aux complexes comme les acétylases/desacétylases. Certaines protéines peuvent être incorporées durant l'assemblage des microtubules. Elles peuvent aussi s'insérer suite à des ouvertures ou des échanges transitoires de sous unité entre les microtubules et la réserve de tubuline soluble (Inoue 1981). De récentes observations ont montré que la tubuline GTP hydrolysable n'était pas seulement détectable à l'extrémité positive croissante des microtubules (GTP cap) mais aussi au niveau de certaines régions proximales des microtubules (Dimitrov et al., 2008). Il a été suggéré que les sous-unités de tubuline-GTP pouvaient être incorporées au niveau de certaines régions des microtubules (Cassimeris, 2009). L'ouverture latérale des microtubules induites par des défauts ou durant un échange de sous-unité avec l'environnement peut apporter une manière simple pour la protéine d'entrer par l'extrémité positive et de diffuser ou se déplacer à l'intérieur du lumen des microtubules.

Localisation spatio-temporelle de l'acétylation Contrairement aux autres modifications post-traductionnelles comme la détyrosination, le marquage de l'acétylation n'est pas sur tout le long des microtubules, indiquant que l' α -tubuline n'est modifiée qu'au niveau de certaines

régions. En mesurant le temps d'acétylation de microtubules courts (coupés) et longs, en présence de l'enzyme α TAT1 et de 3H acetylCoA, on observe des taux d'acétylation similaires, suggérant que α TAT1 peut acétyler la sous unité α à de multiples sites, le long des microtubules, et pas seulement à leurs extrémités (Maruta et al., 1986b).

Les mécanismes et conséquences biologiques d'une acétylation non uniforme des microtubules ne sont pas connus, mais certaines dispositions spécifiques de l'acétylation ont été identifiées. Dans les neurones matures en culture, les microtubules des axones proximaux sont enrichis en acétylation, tandis que les microtubules des corps cellulaires, des dendrites ou du cône de croissance présentent un taux d'acétylation plus faible (Cambray-Deakin and Burgoyne, 1987b; Baas and Black, 1990). Cette distribution semble être spécifique de cette modification, mais elle n'est cependant pas responsable de la polarisation neuronale et de la formation de l'axone, qui résulte spécifiquement d'une stabilisation locale des microtubules (Witte et al., 2008). Dans les cellules interphasiques non neuronales de mammifères, on observe une acétylation des structures composées de microtubules comme le cil primaire (Piperno and Fuller, 1970).

Outre le contrôle spatial de l'acétylation de la tubuline, il existe un contrôle temporel comme par exemple durant la mitose, mais sa fonction n'est pas connue. On observe un taux important d'acétylation de la tubuline durant la mitose/méiose et spécifiquement au niveau du fuseau mitotique (kinetochores et/ou microtubules polaires) (Schatten et al., 1988; Chu and Klymkowsky, 1989). L'étude spatiale et temporelle de l'acétylation durant les premiers stades de développement de la souris a aussi révélé une acétylation sélective de tous les microtubules excepté ceux du midbody en télophase (Schatten et al., 1988).

Les fonctions de l'acétylation

L'acétylation, marqueur de stabilité des microtubules ? L'acétylation est principalement observée au niveau des microtubules stables. Cependant aucun effet de l'acétylation de la lysine 40 n'a été observé sur l'ultra-structure des microtubules (Howes et al., 2014). Il est donc peu probable que cette modification puisse induire directement la stabilité

des microtubules.

L'hypothèse que l'acétylation puisse être une conséquence de la stabilisation des microtubules a été confirmée dans plusieurs études (Cambray-Deakin and Burgoyne, 1987b; Schulze et al., 1987). Dans une expérience de 1989, Daniel R. Webster et Gary Borisy ont analysé le temps de recyclage des microtubules acétylés en micro-injectant de la tubuline purifiée à partir de cerveau et biotynilée dans des fibroblastes de prépuce humain. Ils ont quantifié le taux d'incorporation de la tubuline biotynilée dans les microtubules acétylés et non-acétylés. Ils ont observé qu'une heure après l'injection, tous les microtubules non acétylés contenaient de la biotine tandis que seulement la moitié des microtubules acétylés en contenait. Cela signifie que le taux de renouvellement de ces microtubules est beaucoup plus lent que celui des microtubules non acétylés, et suggère que l'acétylation serait une conséquence de la stabilité des microtubules.

Il a été démontré *in vitro* et *in vivo* que l'acétylation des microtubules n'affectait pas leur stabilité. Par exemple, les cellules épithéliales de rein de rat-kangourou mâle *Potorous tridactylis* (PtK2) possèdent des microtubules stables non acétylés (Piperno and Fuller, 1985; Schulze et al., 1987). *In vitro*, l'acétylation de la tubuline purifiée à partir de cerveaux avec l'acetyltransferase α TAT1 de *Chlamydomonas* n'affecte pas les processus de polymérisation/dépolymérisation des microtubules (Maruta et al., 1986b). Le réseau de microtubules des myocytes atriaux HL-1 est entièrement acétylé mais répond correctement au traitement au nocodazole, ce qui indique non seulement que les microtubules stables mais aussi les microtubules hautement dynamique peuvent être acétylés (Belmadani et al., 2004). Cette hypothèse avait été déjà exposée en 1988 par Gerald Schatten qui avait observé que les microtubules acétylés se lient aux centrosomes d'oocytes murins non fertilisés dans les 30 premières secondes de récupération après exposition au froid.

De même, la présence de microtubules acétylés dans les fuseaux mitotiques précoces (Schatten et al., 1988; Chu and Klymkowsky, 1989) combinée au fait que certains organismes comme *Trypanosoma brucei* présentent de manière globale des microtubules acétylés (Souto-Padron et al., 1993) renforcent l'idée que l'acétylation de la tubuline n'est pas un évènement restreint aux microtubules stables.

L'acétylation des microtubules est aussi un évènement commun aux microtubules naissants puisque dans certaines expériences de reconstruction après traitement au nocodazole, les microtubules naissants peuvent présenter une acétylation de leur tubuline. Les microtubules naissants croissent et résistent au désassemblage, y compris suite à un traitement au nocodazole, présentant à la fois les caractéristiques des microtubules stables et instables à un temps donné.

L'ensemble de ces études montrent que l'acétylation des microtubules n'est pas spécifique d'une sous population stable des microtubules bien qu'ils soient tous modifiés post-traductionnellement. Il est important de se rappeler que l'acétylation des microtubules peut affecter une autre sous-population de microtubules dans des cas ou types cellulaires particuliers.

Lien entre l'acétylation et la structure des microtubule L'acetylation de la tubuline pourrait aussi affecter la structure des microtubules. En effet les microtubules des neurones sensibles au toucher chez *C. elegans* ont 15 protofilaments, et des mutations de MEC17 induisent une réduction du nombre de microtubules dans ces neurones ainsi qu'une variabilité du nombre de protofilament (Topalidou et al., 2012; Cueva et al., 2012). Un effet de l'acetylation sur les protofilaments n'a pas été observé dans les autres systèmes ou sur les microtubules qui sont constitués de 13 protofilaments. De plus les études de cryo-electron microscopy n'ont pas permis d'observer des différences de structure entre les microtubules acetylés et non-acetylés (Howes et al., 2014).

L'acetylation participerait à la régulation du transport intracellulaire L'étude des potentielles fonctions de l'acétylation de la lysine 40 de la tubuline suggère un rôle de cette modification dans la régulation du transport intracellulaire en contrôlant le trafic dépendant des kinésines (Reed et al., 2006; Dompierre et al., 2007). Les études *in vivo* (Hammond et al., 2010) ainsi que des études biophysiques *in vitro* d'analyse de vitesse et longueur de course n'ont pas permis de confirmer l'hypothèse d'un lien entre acetylation des microtubules et processivité des moteurs (Walter et al., 2012; Kaul et al., 2014) suggérant que l'acétylation de la lysine 40 affecterait le trafic intracellulaire de manière indirecte.

L'acétylation est localisée sur la surface interne des microtubules (Soppina et al., 2012b) ce qui modulerait l'interaction de protéines situées à l'intérieure des microtubules, mais celles-ci sont peu connues (Nicastro et al., 2011).

En résumé,

- La dynamique des microtubules joue un rôle essentiel dans l'organisation et le remodelage rapide du cytosquelette, permettant aux microtubules d'explorer l'environnement cytoplasmique
- Les microtubules sont des structures très conservées. Afin de générer une diversité fonctionnelle, les sous-unités α et β de la tubuline subissent de nombreuses modifications post-traductionnelles.
- L'acétylation des microtubules est une monomodification localisée sur la surface luminale des microtubules. L'enzyme acétylant spécifiquement le résidu lysine 40 de l' α tubuline est α TAT1.

3

Le rôle et la régulation des microtubules durant la migration cellulaire

3.1 Les microtubules participent à la formation de la protrusion cellulaire

Durant la migration cellulaire, la direction de migration est déterminée par l'orientation et la localisation de la protrusion. La formation de la protrusion cellulaire nécessite la génération de forces par le cytoplasme.

Dans certains types cellulaires, comme les leucocytes, la polymérisation de l'actine est responsable de l'extension de la protrusion et permet la formation d'un lamellipode duquel les microtubules sont absents (Euteneuer and Schliwa, Euteneuer and Schliwa) (Keren et al., 2008) (Figure 3.1).

Au contraire, les microtubules jouent un rôle primordial dans la formation de la protrusion dans les astrocytes et les neurones. Dans les astrocytes, le lamellipodium est limité et les microtubules atteignent quasiment le front de migration. Une légère perturbation du réseau de microtubules inhibe totalement la formation de la protrusion .

Dans la majorité des types cellulaires, comme les fibroblastes, les cellules épithéliales et endothéliales, la migration est dépendante à la fois du réseau d'actine et de microtubules. Dans ce cas, la plupart des microtubules ne pénètrent pas dans le lamellipode occupé majoritairement par l'actine (Waterman-Storer and Salmon, 1997) (Figure 3.1). Néanmoins, quelques microtubules y sont présents et sont impliqués dans la régulation de la protrusion et de la migration de la cellule.

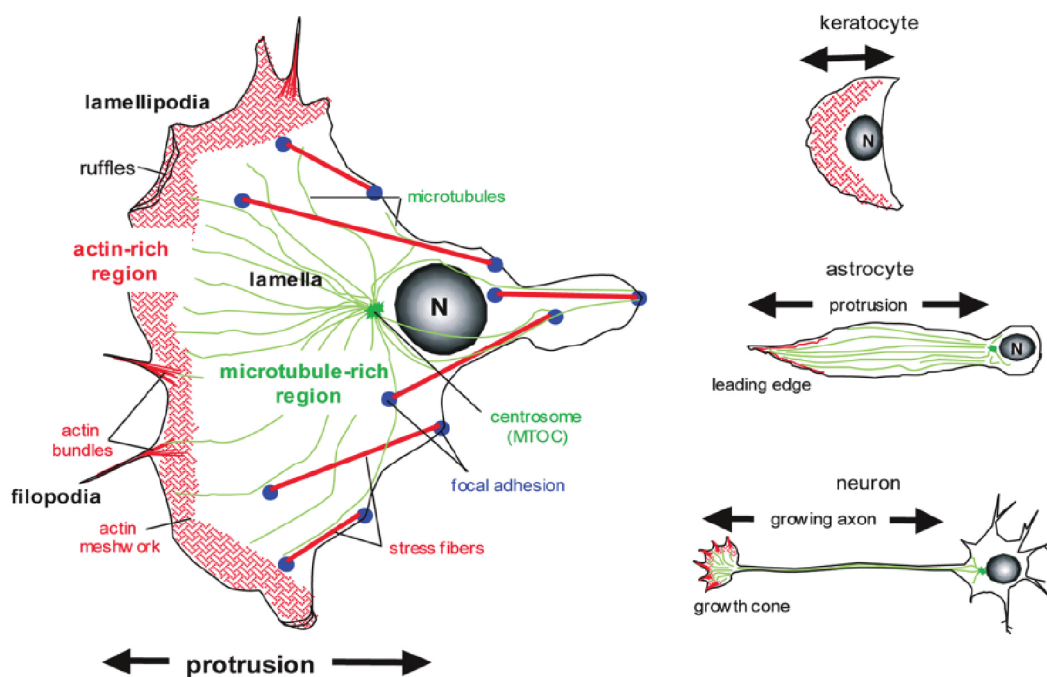


FIGURE 3.1 – Organisation de l’actine et des microtubules dans la protrusions cellulaire

(à gauche) On distingue une région riche en actine (rouge) formant le lamellipode et une région riche en microtubules (vert). (à droite) L’étendue des différentes aires diffère selon le type cellulaire. Dans les kératynocytes, la protrusion est essentiellement composée d’actine, tandis que les astrocytes et les neurones possèdent une petite région riche en actine et une importante région riche en microtubules. D’après (Etienne-Manneville, 2004a)

Les microtubules contribuent au contrôle de la protrusion cellulaire via (Figure 3.2) :

- leur dynamique,
- leur rôle dans le trafic intracellulaire,
- leur implication dans différentes voies de signalisation

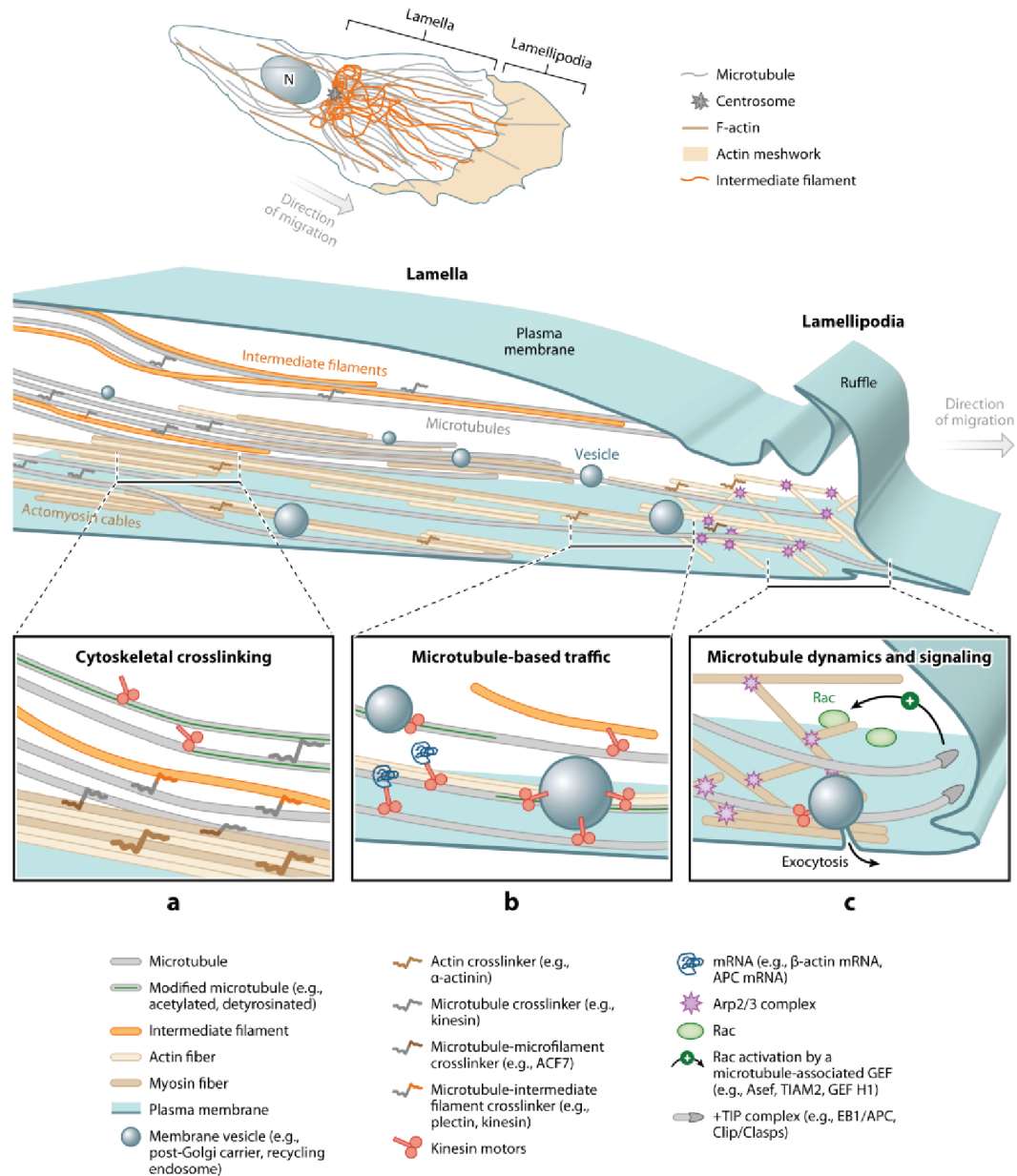


FIGURE 3.2 – Le rôle des microtubules dans la protrusion cellulaire

Les microtubules contribuent de différentes manières au contrôle de la protrusion cellulaire : via leur dynamique, leur rôle dans le trafic intracellulaire et leur implication dans différentes voies de signalisation. Abbreviations : APC, adenomatous polyposis coli ; EB, end-binding protein ; GEF, guanine nucleotide exchange factor ; N, nucleus ; +TIP, plus-end tracking protein (Etienne-Manneville, 2013a).

La dynamique des microtubules participent à la formation de la protrusion cellulaire

Les microtubules participent au maintien de la forme des cellules. Ils peuvent résister à d'importantes forces de compression (Brangwynne et al., 2007). En effet, la polymérisation des microtubules peut générer une force de quelques pN, comparable à la force pouvant être générée par des moteurs moléculaires (Dogterom and Yurke, 1997).

Cette force pouvant être générée par les microtubules est nécessaire à la formation de la protrusion. Pour cela les microtubules doivent atteindre la membrane plasmique au front de migration. Dans la plupart des types cellulaires, seulement une dizaine de microtubules sont présents au sein du lamellipode et interagissent avec le front de migration (Figure 3.2). Ces microtubules ne peuvent pas développer une force suffisante pour pousser la membrane plasmique vers l'avant, qui expérimentalement résiste à environ $1.000\text{pN}/\mu\text{m}$ (Mogilner and Oster, 2003). Dans les astrocytes, le lamellipode est restreint et la majorité des microtubules atteignent quasiment le front de migration.

In vivo, l'élongation des microtubules est favorisée à l'avant par de nombreuses protéines +TIPs, qui interagissent spécifiquement avec l'extrémité "plus" des microtubules pour influencer leur dynamique (Figure 3.2.c) (Akhmanova and Steinmetz, 2015).

La régulation de l'extrémité "plus" des microtubules par les +TIPs

Rôle d'APC dans la migration APC est localisé à l'extrémité de la protrusion cellulaire dans de nombreux types cellulaires comme les fibroblastes, les astrocytes et les neurones. APC forme des amas à l'extrémité "+" des microtubules, mais peut aussi parfois se situer le long des microtubules. La formation de la protrusion cellulaire durant la migration affecte la localisation d'APC en contribuant à son interaction avec l'extrémité "+" et ainsi qu'à son recrutement au front de migration. Le recrutement d'APC nécessite la kinésine Kif3, suggérant qu'APC est transporté via le réseau de microtubules.

APC interagit avec EB1. Cette interaction est régulée par différents paramètres. Par exemple PLA et p24cdc2 phosphorylent APC et inhibent son interaction avec EB1. A l'inverse, l'effecteur de Rho, mDia,

peut directement s'associer avec APC et EB1, et agir comme un "pont" afin d'augmenter leur association (Figure 3.3).

L'accumulation d'APC au front de migration nécessite une régulation spatiale de l'activité de GSK3 β . Durant la migration astrocytaire, GSK3 β est phosphorylé via la voie Par6/Cdc42/PKC induisant l'association d'APC avec l'extrémité "+" des microtubules. Le mécanisme de régulation de l'association d'APC avec les microtubules par GSK3 β n'est pas totalement résolu. GSK3 β pourrait indirectement contrôler le trafic d'APC sur les microtubules. GSK3 β peut aussi directement phosphoryler APC et modifier l'affinité pour les microtubules.

APC peut aussi affecter la dynamique des microtubule (Figure 3.3). En effet APC possède une grande affinité pour les sous-unités de tubuline et promeut l'assemblage des microtubules *in vitro* et *in vivo*. APC peut aussi contribuer à la stabilité des microtubules via la phosphorylation de GSK3 β . Ainsi APC semble être directement et indirectement impliqué dans l'élongation et la stabilité des microtubules.

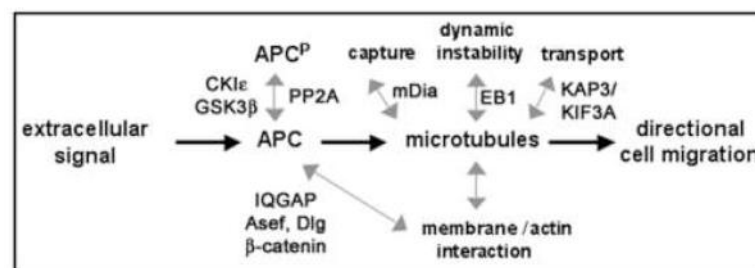


FIGURE 3.3 – Rôle d'APC dans la migration cellulaire

Les flèches en gris claires indiquent les potentielles modification de phosphorylation d'APC ainsi que les possibles interactions non élucidées (Barth et al., 2008)

le "crosstalk" entre les différents membres du cytosquelette participe à la formation de la protrusion cellulaire. La forme et la mécanique de la cellule sont régulées par la coopération entre les trois différents membres du cytosquelette (Figure 3.2 et 3.4). Malgré des différences de structures et de propriétés physiques, ces trois éléments participent à des fonctions communes nécessaires à la mise en place et au maintien de la polarité cellulaire, durant la migration et aussi à la mécano-réactivité (Rodriguez et al., 2003; Chung et al., 2013).

De nombreuses études ont mis en évidence des interactions indirectes entre les différents éléments du cytosquelette via des signaux biochimiques (Etienne-Manneville, 2013a). Ces éléments peuvent aussi interagir directement, avec ou sans intermédiaires (Huber et al., 2015) (Figure 3.4), ou via des effets stériques. En effet, des études *in vivo* et *in vitro* ont mis en évidence une interaction directe entre les filaments d'actine et la vimentine, protéine de filaments intermédiaires (Esue et al., 2006), ainsi qu'entre les neurofilaments et les microtubules (Hisanaga and Hirokawa, 1990).

La coopération entre ces différents éléments joue aussi un rôle très important durant la migration cellulaire durant laquelle elle contribue à la régulation de la forme de la cellule à travers une série de processus de remodelage dépendant du type cellulaire et de l'environnement extra-cellulaire (Friedl and Wolf, 2010). Ainsi cette coopération participe à la formation de la protrusion cellulaire via la génération de forces nécessaires à sa formation. Le réseau de cytosquelette permet l'extension de cette protrusion, la régulation de l'adhésion à la matrice nécessaire à la transmission des forces générées au niveau du substrat.

La coopération entre les trois éléments participant aussi à l'organisation polarisée du réseau de microtubules nécessaire à la directionnalité de la migration. Jusqu'à récemment, il est admis que l'établissement de cette polarité était régulée par la coopération entre les filaments d'actine et les microtubules via leur interaction avec l'adhésion à la matrice et le noyau. Cependant de nombreuses études ont décrit l'implication des filaments intermédiaires dans la régulation de la polarité cellulaire (Dupin et al., 2011; Shabbir et al., 2014; Gan et al., 2016).

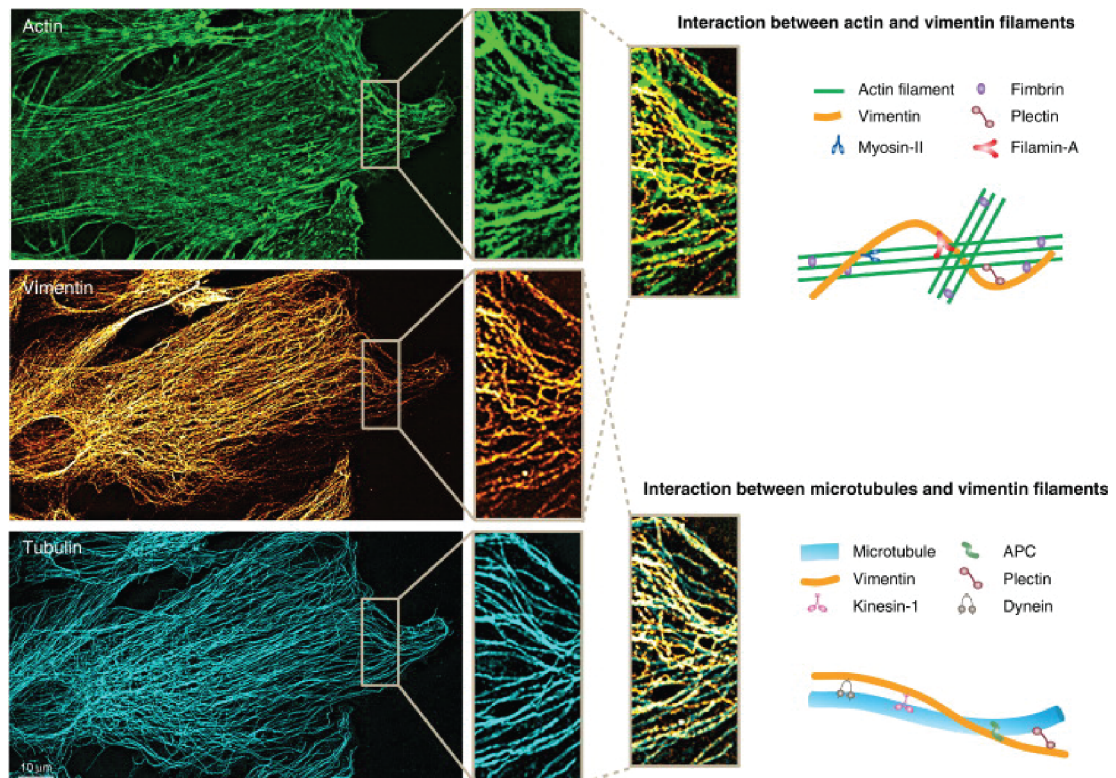


FIGURE 3.4 – **Coopération entre les trois éléments du cytosquelette** à gauche, images des différents éléments du cytosquelette, dans des astrocytes en migration, acquises par 3D-structured illumination microscopy. On observe l’association étroite entre les différents éléments composant le cytosquelette. A droite, les schémas représentent les différentes interactions existantes, entre les filaments intermédiaires avec l’actine et les microtubules (Leduc and Etienne-Manneville, 2015).

Le trafic intracellulaire via les microtubules contribue à la protrusion cellulaire

En plus des forces générées, la formation de la protrusion cellulaire nécessite aussi le transport ciblé et polarisé de membranes et de protéines associées pour réapprovisionner la membrane plasmique au front de migration (Figure 3.1.b).

Lorsque le transport polarisé de composants se fait exclusivement par diffusion ou par un transport via l’actine, la présence des microtubules près du front de migration est essentielle, car elle permet le transport de vésicules contribuant à la régulation de la protrusion. Les vésicules partant de l’appareil de Golgi et les endosomes sont transportés via les microtubules en direction du front de migration (Miller et al., 2009). L’organisation des microtubules et leur trafic associé sont essentiels à

la régulation de la protrusion aussi bien en 2D qu'en 3D (Gierke and Wittmann, 2012).

Les protéines de signalisation associées au recyclage de la membrane par les endosomes sont aussi essentielles pour la migration cellulaire. Les GTPases Rac et Cdc42 (Figure 3.1.c) sont délivrées au niveau de la membrane plasmique (Osmani et al., 2010). Les moteurs moléculaires vont aussi apporter des ARN messagers codant pour des protéines impliquées dans la mobilité cellulaire, telles que la β -actine et les protéines du complexe Arp2/3 qui contribuent à la polymérisation des filaments d'actine (Mingle et al., 2005; Oleynikov and Singer, 1998).

La signalisation dépendante des microtubules induit la régulation de la protrusion cellulaire

En plus d'agir directement sur la formation de la protrusion, les microtubules y jouent aussi un rôle indirect en interagissant avec et en régulant des molécules de signalisation, comme les GTPases Rho qui contribuent localement à la polymérisation de l'actine (Waterman-Storer and Salmon, 1999).

Les microtubules peuvent apporter et/ou activer un certains nombres de GEFs (guanine nucleotide exchange factors) au niveau de la protrusion. Par exemple, la croissance des microtubules vers le front de migration peut activer Asef, une GEF de Rac qui interagit avec APC (Kawasaki, 2000). La GEF de Rho est impliquée dans la régulation des microtubules. RhoGEF-H1 interagit directement avec les microtubules et est inactivée ; son activité étant induite par la dépolymérisation des microtubules (Chang et al., 2007; Krendel et al., 2002).

3.2 Les microtubules contribuent à la mise en place de la polarité cellulaire durant la migration

3.2.1 Le réseau de microtubules est polarisé et asymétrique dans les cellules en migration

Dans les cellules immobiles, le réseau de microtubules est radialement organisé et ne présente pas de polarité évidente. Dans les cellules en migration le réseau de microtubules est asymétrique et est orienté dans la direction de la migration. Cela résulte en partie de l'orientation parallèle de l'axe noyau-centrosome par rapport à la direction de migration.

Dans la plupart des types cellulaires comme les fibroblastes, les astrocytes, les neurones, les cellules épithéliales et endothéliales, le centrosome est localisé à l'avant du noyau dans la direction de la migration (Luxton and Gundersen, 2011; Etienne-Manneville, 2013a). Seuls quelques microtubules atteignent l'arrière de la cellule et entourent le noyau. La majorité d'entre eux s'allongent vers le front de migration. L'organisation polarisée du réseau de microtubules semble être la conséquence de différences subtiles des propriétés des microtubules à l'avant et à l'arrière des cellules.

La dynamique des microtubules diffère à l'avant de l'arrière des cellules en migration (Komarova et al., 2002; Wadsworth, 1999). Les microtubules peuvent être capturés à l'avant afin de polariser leurs fonctions en contribuant à leur interaction avec les organelles, et par conséquent, le trafic dépendant des microtubules. La capture de l'extrémité "plus" des microtubules permet leur ancrage à l'avant au niveau du cortex cellulaire. Celui-ci induit un attachement fort des microtubules et évite ainsi la perte de microtubules à l'avant de la cellule causé par le flux rétrograde d'actine (Etienne-Manneville, 2013a).

La capture et l'ancrage des microtubules peut générer des forces via les moteurs moléculaires qui leur sont associés afin de modifier la localisation de structures cellulaires précises et contrôler l'architecture intracellulaire.

3.2.2 La régulation polarisée du réseau de microtubules à la périphérie de la cellule

La polarisation cellulaire s'effectue au début de la migration. Elle est induite par un gradient chimique ou par la localisation spécifique des intégrines. Le recrutement et l'activation des GTPases Rho, Cdc42 et Rac au front de migration sont des événements clés qui initie la polarisation cellulaire et la migration dirigée (Hall, 2005; Vega and Ridley, 2008).

L'activation local de Cdc42 est le premier événement crucial permettant la polarisation du réseau de microtubules. Cdc42 est régulée par de multiples signaux de polarité (Etienne-Manneville, 2004b). Lors d'un test de migration collective, l'engagement des intégrines à l'avant induit l'activation de β PIX par Src et Scrib, qui agissent comme une GEF spécifique de Cdc42 et contribue aussi au recrutement de Rac, activé indépendamment (Osmani et al., 2006). Dans ce test, la localisation des signaux induits par les intégrines est contrôlée par les jonctions inter-cellulaires, qui permettent l'activation restreinte des intégrines à l'avant de la cellule (Camand et al., 2012).

Suivant le type cellulaire, l'activation localisée de Cdc42 contribue à la localisation ou l'activation de Rac au front de migration. L'interaction de Rac avec β PIX et PAK induit le recrutement de Rac dans les fibroblastes, les astrocytes et les cellules épithéliales (Osmani et al., 2006).

Le gradient d'activité des ces GTPases est crucial pour la polarisation du réseau de microtubules. Il permet la transmission de signaux extra-cellulaires polarisés régulant la dynamique et les fonctions des microtubules et ainsi une polarisation globale du réseau. Rac et Cdc42 induisent la croissance des microtubules et simultanément la polymérisation de l'actine, coordonnant ainsi l'activité de deux réseaux de cytosquelette pour permettre la formation de la protrusion.

Les GTPases Rho régulent aussi l'association des protéines +TIPs présents à l'extrémité positive des microtubules. Le complexe Par, formé par Par6, aPKC et dans certains cas Par3 est impliqué dans la polarisation d'un grand nombre de processus, dont la polarisation avant-arrière du réseau de microtubules (Etienne-Manneville and Hall,

2002a). Il régule essentiellement les kinases GSK3 (α et β). Cdc42, une fois activée, se lie et recrute Par6, qui va en retour induire l'activation de aPKC (Etienne-Manneville and Hall, 2001). Dans les astrocytes en migration, cette activation localisée induit la phosphorylation et l'inhibition de GSK3 β (Etienne-Manneville and Hall, 2003). GSK3 régule de nombreuses protéines +TIPs et stabilise des MAPs. Dans les astrocytes en migration, l'inhibition de l'activité de GSK3 β au front de migration induit le recrutement d'APC à l'extrémité "+" des microtubules.

En contrôlant la dynamique des extrémité "+" des microtubules, la régulation polarisée des +TIPs affecte aussi l'interaction des microtubules avec les protéines corticales ou membranaires. Ces interactions sont cruciales pour le contrôle de l'organisation polarisée des microtubules et des organelles en contact avec les microtubules. L'interaction entre les +TIPs et leurs partenaires du cytosquelette ou corticaux est aussi régulée, ajoutant ainsi un degré de complexité et de précision dans la régulation de la polarisation du réseau de microtubules. Ce type de régulation repose essentiellement sur le contrôle de la localisation spécifique au niveau du cortex, de partenaires des +TIPs. APC, par exemple, peut interagir avec des protéines corticales et certaines liées à l'actine. APC interagit directement avec le domaine PDZ de Dlg1, et cette interaction est nécessaire pour la capture des microtubules au cortex à l'avant durant la migration astrocytaire (Etienne-Manneville et al., 2005). Cette interaction est contrôlée par le recrutement coordonné de deux protéines à l'avant des cellules. L'activation d'aPKC à l'avant n'est pas seulement requise pour permettre l'accumulation d'APC à l'extrémité "+" des microtubules mais contribue aussi simultanément à l'accumulation de Dlg1 au niveau du cortex basal (Etienne-Manneville et al., 2005). L'interaction entre APC et Dlg1 induit la capture des extrémité positive des microtubules au cortex cellulaire.

L'utilisation spécifique d'un mécanisme de capture des microtubules dépend du type cellulaire ou est influencé par l'environnement cellulaire, la nature et la position des signaux de polarité. Par exemple, chez les astrocytes, CLIP-170 est très peu exprimé, et APC est l'acteur majeur dans l'ancrage des microtubules. Dans ces cellules, l'ancrage des microtubules s'effectue à des sites distincts des plaques d'adhérences (Manneville et al., 2010), tandis que l'interaction entre clasps et LL5 β

est dans le ciblage des microtubules au niveau des plaques d'adhérence (Mimori-Kiyosue et al., 2005). Dans les cellules épithéliales, LL5 α/β est recruté au niveau de la membrane basale et capture les microtubules à proximité des récepteurs $\alpha3\beta1$ et $\alpha6\beta4$ (Hotta et al., 2010).

L'acétylation et la détyrosination des microtubules sont fréquemment observées au niveau de la protrusion cellulaire au cours de la migration (Gundersen and Bulinski, 1988). Ces modifications pourraient moduler le trafic vésiculaire dépendant des microtubules. Par exemple, la détyrosination des microtubules inhibe le recrutement de +TIPs et de moteurs tels que MCAK et KIF12A (Peris et al., 2009). Une sous-population de microtubules modifiés s'étend depuis le centrosome jusqu'au front de migration dans les fibroblastes en migration ce qui pourrait favoriser le recrutement spécifique de moteurs et ainsi contribuer au trafic vésiculaire polarisé (Bulinski and Gundersen, 1991).

3.3 Les microtubules régulent la dynamique de l'adhésion cellulaire à la matrice

La migration cellulaire dirigée nécessite la génération de forces de traction à l'avant de la cellule pour la déplacer. Ces forces sont générées par les câbles d'actomyosine présents dans la protrusion et ancrés à l'avant à certains sites spécifiques. L'intégration de sites d'adhésion à la matrice extra-cellulaire via les intégrines et connectés aux filaments d'actine permettent à la cellule d'avancer durant la migration mésenchymale (Wolfenson et al., 2009).

Les plaques d'adhérence se forment au front de migration où elles vont croître pour former des complexes au sein du lamellipode (cf Chapitre1). La plupart de ces plaques d'adhérence vont rapidement être désassemblées, mais certaines peuvent s'allonger et former des plaques d'adhérence matures qui se désassemblent généralement à l'arrière de la cellule (Parsons et al., 2010). Le contrôle spatio-temporel de la dynamique des plaques d'adhérence est essentiel pour permettre aux cellules de répondre aux signaux extracellulaires et induire leur mouvement coordonné.

Les microtubules participent aussi à la maturation des plaques d'adhérence en modulant la signalisation via RhoGTPase, ainsi que

l'endocytose dépendante/indépendant de la clathrine. De plus, les microtubules associés aux plaques d'adhérence semblent assurer un chemin polarisé pour la sécrétion localisée de certaines metalloprotéases (MMPs).

La dynamique des microtubules est essentielle à l'assemblage et au désassemblage des plaques d'adhérence. Dans de nombreux types cellulaires, les microtubules semblent être physiquement associés aux plaques d'adhérence durant la migration (Rinnerthaler et al., 1988) et différents types de protéines interagissant avec l'extrémité "+" des microtubules sont impliquées dans leur interaction avec les plaques d'adhérence (Stehbens and Wittmann, 2012).

3.3 Les microtubules régulent la dynamique de l'adhésion cellulaire à la matrice

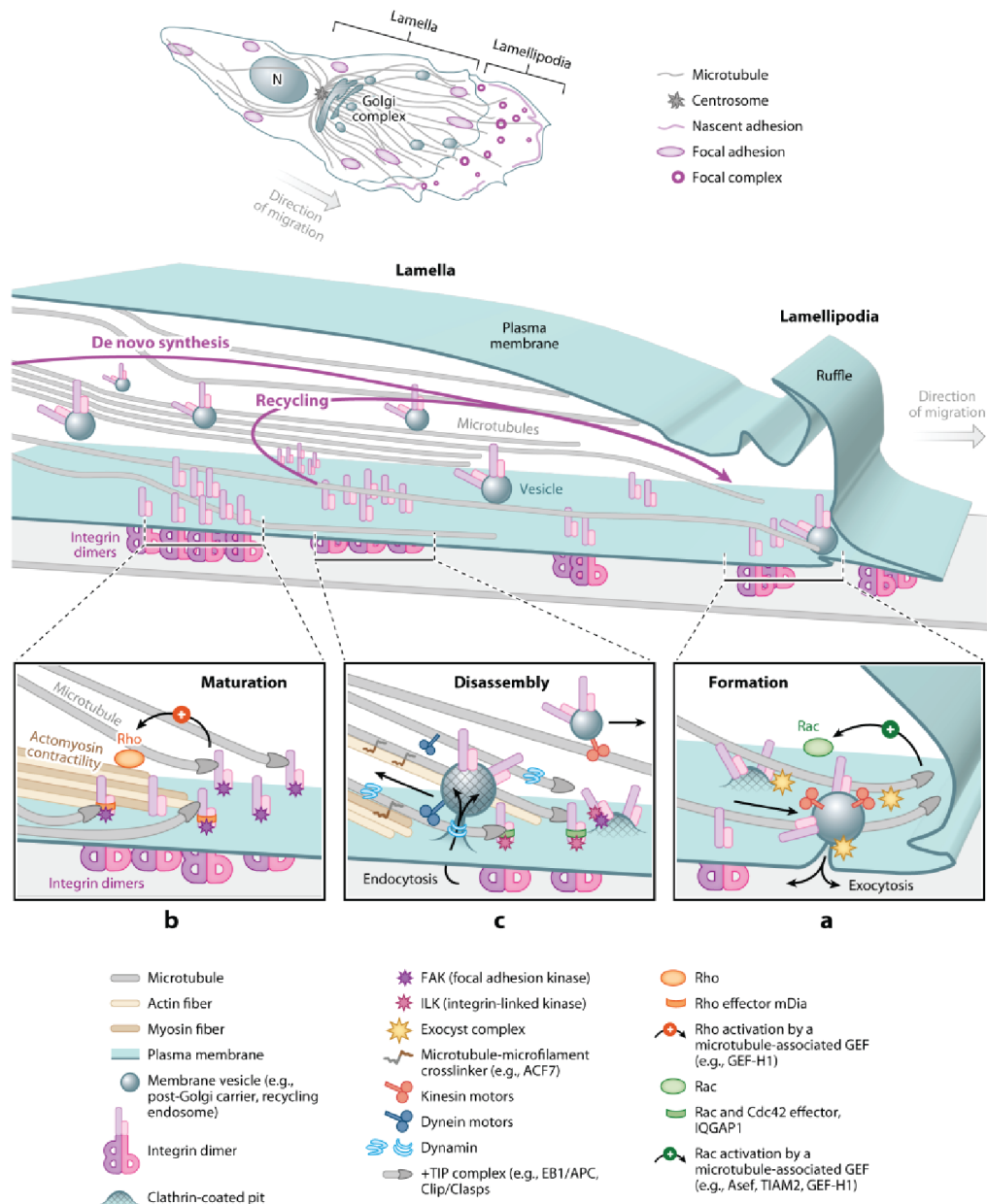


FIGURE 3.5 – Régulation de la dynamique des plaques d'adhésion par les microtubules durant la migration

Abbreviations : APC, adenomatous polyposis coli ; EB, end-binding protein ; GEF, guanine nucleotide exchange factor ; N, nucleus. adapté de Etienne-Manneville S. Annual review of Cell and Developmental Biology (2013) (Etienne-Manneville, 2013a)

Les microtubules régulent l'exocytose au niveau des plaques d'adhésion

Les plaques d'adhésion se forment à l'avant des cellules en migration et ce simultanément à la formation du lamellipode. L'activation de Rac, via les microtubules, induit indirectement la formation de nouvelles

plaques d'adhérence (Figure 3.7) (Rooney et al., 2010).

De plus, les microtubules sont essentiels pour le trafic polarisé des intégrines à l'avant de la cellule (Bretscher and Aguado-Velasco, 1998). Les intermédiaires nécessaires à la fusion des vésicules d'exocytose avec la membrane plasmique sont localisés au niveau des plaques d'adhérence naissantes avant leur croissance (Spiczka and Yeaman, 2008). Les microtubules ciblent les sites d'adhésion matures et sont ancrés à la membrane plasmique (Kaverina et al., 1998). L'inhibition de la dynamique des microtubules perturbe l'exocytose des intégrines durant la neuritogénèse (Gupton and Gertler, 2010). De plus la stabilisation localisée des microtubules ancrés à la membrane plasmique pourrait faciliter le transport des intégrines et participer à la croissance des sites d'adhésions au front de migration des cellules en migration (Gu et al., 2011).

Les plaques d'adhérence se désassemblent majoritairement à l'arrière du lamellipode, mais certains complexes peuvent persister et croître (figure). Cela est dû à l'augmentation des forces générées par les câbles du complexe d'actomyosine liés aux intégrines. Il n'existe pas de preuve directe du rôle des microtubules dans la croissance des plaques d'adhérence, mais ils pourraient fortement l'influencer en régulant la contractilité du complexe d'acto-myosine (Waterman-Storer and Salmon, 1999) (figure).

APC est transporté le long des microtubules et s'accumule à leur extrémité plus. Il est étroitement associé aux plaques d'adhérence et pourrait induire leur assemblage par un mécanisme qui reste à résoudre (Etienne-Manneville, 2009). Une des hypothèses serait qu'APC s'associe avec et active FAK (focal adhesion kinase) et la Paxilline (Matsumoto et al., 2010). D'autre part, APC et des protéines associées à l'extrémité "+" des microtubules comme Clip-170 et Clasps, peuvent promouvoir la nucléation de l'actine en interagissant avec Rac, l'effecteur de Cdc42 IQGAP (Brandt and Grosse, 2007) et avec la formine mDia (Breitsprecher et al., 2012; Okada et al., 2010).

Les microtubules pourraient aussi influencer la dynamique des plaques d'adhérence en régulant localement la voie de signalisation RhoGTPase, qui contrôle la contractilité du complexe d'acto-myosine. En effet l'étude de différents types cellulaires a démontré que la dépo-

lymerisation des microtubules induite pharmacologiquement augmenterait l'activité de Rho et la contractilité cellulaire ainsi que l'assemblage des sites d'adhésion (Waterman-Storer and Salmon, 1999). Au contraire, la polymérisation du réseau de microtubules après lavage des drogues dépolymérisantes, tel que le nocodazole, induit un désassemblage rapide des plaques d'adhérence (Ezratty et al., 2005). De plus la polymérisation des microtubules à l'avant induit l'activation locale de Rac1, provoquant la formation des complexes d'adhésion (Waterman-Storer and Salmon, 1999) tandis que l'activité de Rho induit la croissance des plaques d'adhérence (Etienne-Manneville and Hall, 2002b).

Dans les fibroblastes polarisés, l'adhésion au substrat induit la stabilité de certains microtubules, associée à la présence de modifications post-traductionnelles comme la détyrosination et l'acétylation (Palazzo et al., 2001a).

les microtubules régulent l'endocytose des intégrines

Les microtubules régulent aussi le désassemblage des plaques d'adhérence via leur implication dans la régulation de l'endocytose des intégrines (Caswell and Norman, 2008). La dynamine est nécessaire pour la scission des vésicules à la membrane plasmique, et est localisée au niveau des plaques d'adhérence. Elle est requise pour leur désassemblage dans les cellules en migration *in vitro*, probablement en induisant l'internalisation des complexes d'intégrines. FAK recrute la dynamine aux plaques d'adhérence et permet son activation (Ezratty et al., 2005). La dynamine interagit aussi avec les microtubules.

Les microtubules peuvent s'associer aux plaques d'adhérence

Les microtubules participent aussi au désassemblage des plaques d'adhérences. En effet, le traitement de cellules au nocodazole induit l'accumulation de longues plaques d'adhérence (Waterman-Storer and Salmon, 1999). Lorsque la drogue est supprimée du milieu, les microtubules se repolymérisent rapidement et les plaques d'adhérence se désassemblent (Waterman-Storer et al., 1999b).

Dans les fibroblastes en migration, les microtubules sont ancrés au niveau du centrosome et s'étendent à la périphérie de la cellule.

Ils peuvent cibler spécifiquement et à maintes reprises les plaques d'adhérences matures (Kaverina et al., 1998; Krylyshkina et al., 2003). L'instabilité dynamique permet aux microtubules d'individuellement s'associer plusieurs fois à certaines plaques d'adhérence (Kaverina et al., 1998) et cette association s'effectue plus fréquemment dans les zones de désassemblage des sites d'adhésion (Rid et al., 2005). De plus, l'observation des microtubules par microscopie à onde évanescente a montré que leur extrémité "+" se situait à proximité (<100nm) de la membrane plasmique au niveau des plaques d'adhérence (Ezratty et al., 2005). Le mécanisme qui permet aux microtubules de reconnaître et interagir avec les plaques d'adhérence à désassembler n'est pas entièrement résolu.

L'interaction entre les microtubules et les plaques d'adhérence affecte la stabilité des microtubules. En effet, chaque interaction entre les microtubules et les plaques d'adhérence est associée à une pause de la polymérisation des microtubules suivie d'une rapide dépolymérisation et d'un désassemblage de la plaque d'adhérence ciblée. Le mécanisme moléculaire n'est pas totalement compris, mais l'assemblage des plaques d'adhérence dépendant des microtubules pourrait impliquer la paxilline, qui induirait une "catastrophe" des microtubules au niveau des plaques d'adhérence (Efimov et al., 2008). De plus, la paxilline est phosphorylée par FAK, un important régulateur de la dynamique des plaques d'adhérence. FAK régule la stabilité des microtubules à la périphérie de la cellule (Palazzo et al., 2004) et est nécessaire pour le désassemblage des plaques d'adhérence par les microtubules (Ezratty et al., 2005).

Le même type d'interaction peut aussi s'observer au niveau des jonction inter-cellulaire via les cadhérines. Cependant, dans cette zone, de nombreuses conformations du réseau de microtubules sont présentes (figure) Dans les épithélium, les microtubules sont souvent observés parallèles à la surface latérale et leur extrémité + orientée vers la face basale (Bartolini and Gundersen, 2006).

microtubules sont recrutés et stabilisés au niveau des plaques d'adhérence

Le recrutement des microtubules au niveau du cortex cellulaire est nécessaire pour de nombreux processus tels que la division, la migration et la différenciation cellulaire.

L'instabilité dynamique des microtubules leur permet d'explorer l'espace tridimensionnel de la cellule afin de trouver des sites spécifiques d'interaction et d'attachement. M. Kirschner et T. Mitchinson ont proposé l'hypothèse de stabilisation sélective selon laquelle des signaux externes activeraient localement des facteurs corticaux afin de stabiliser des microtubules dynamiques à certains sites. De nombreuses études dans différents systèmes ont démontré la capture des microtubules au niveau du cortex en observant des changements de dynamiques de comportements des microtubules au niveau de certains sites corticaux quand certaines voies de signalisation sont spécifiquement activées. Les protéines +TIPs ainsi que des récepteurs corticaux jouent un rôle important dans cette capture des microtubules au cortex.

Dans de nombreux types cellulaires incluant les cellules en migration, les microtubules et les filaments d'actine interagissent (Salmon et al., 2002; Rodriguez et al., 2003). Les microtubules explorant l'espace cytoplasmique sont stabilisés au front de migration (Kirschner and Mitchison, Kirschner and Mitchison), et leur croissance est guidée le long des câbles d'actine vers les plaques d'adhérence (Krylyshkina et al., 2002; Small et al., 2002). De nombreuses protéines pouvant localement effectuer le lien physique entre les microtubules, les filaments d'actine et les plaques d'adhérence ont été identifiées, comme par exemple CLASPs ou la spectraplakine ACF7/MACF1 qui se situe dans le cortex cellulaire au niveau des plaques d'adhérence par l'intermédiaire d'APC (Wu et al., 2011) (Zaoui et al., 2010). Ces protéines se situent au niveau de l'extrémité "+" des microtubules via leur interaction avec EB1 (Akhmanova and Steinmetz, 2008). Elles sont aussi impliquées dans l'organisation et la stabilisation des microtubules au front de migration et se situent près des plaques d'adhérence.

APC est transporté le long des microtubules et s'accumule à l'extrémité "+" d'une sous population de microtubule (figure) (Näthke et al., 1996). Les clusters d'APC sont étroitement associés aux plaques d'adhérence et peuvent promouvoir leur assemblage (Matsumoto et al., 2010). Il est possible qu'APC participe à la stabilisation des plaques d'adhérence naissantes en tant que régulateur de polarité.

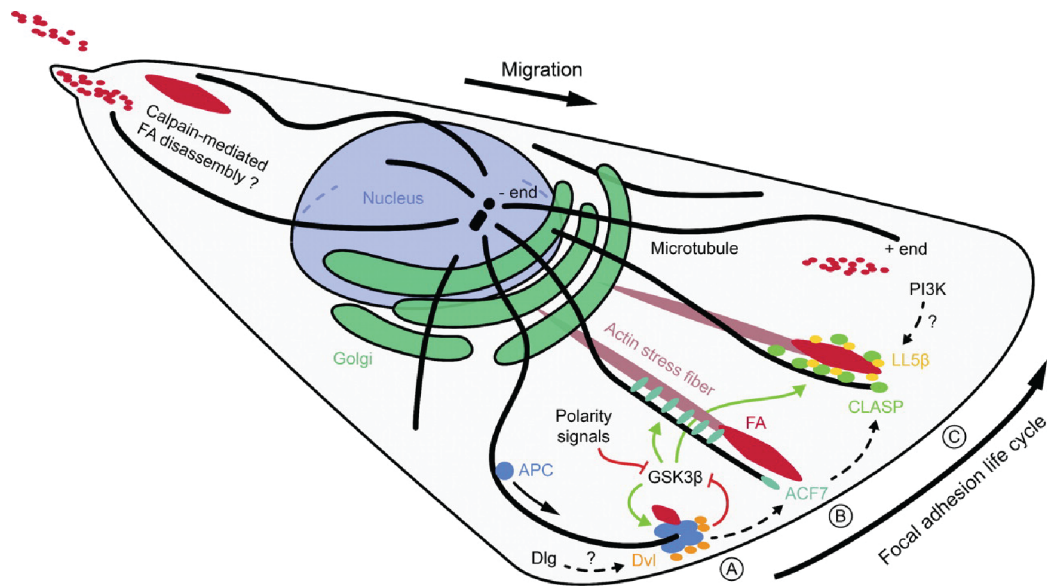


FIGURE 3.6 – Les interactions entre les +TIP des microtubules et les plaques d’adhérence

Les plaques d’adhérence se forment au front de migration. La contractilité du complexe d’acto-myosine induit la maturation des complexes puis les sites d’adhésion se désassemblent pour induire le déplacement du corps cellulaire. Les interactions entre les +TIPs des microtubules et les plaques d’adhérence contribuent à la régulation de leur dynamique. **A.** APC est transporté le long des microtubules jusqu’au front de migration et serait impliqué dans la stabilisation des plaques d’adhérence naissantes. **B.** ACF7/MACF1 permet l’interaction entre les microtubules et les fibres de stress d’actine, et est requis pour le guidage de la croissance des microtubules vers les plaques d’adhérence. **C.** CLASPs stabilisent les microtubules au niveau des plaques d’adhérence matures. L’accumulation de CLASPs dépend de son interaction avec LL5 β . D’après (Stehbens and Wittmann, 2012)

Les microtubules contrôlent le trafic vésiculaire impliqué dans la régulation de la dynamique des plaques d’adhérence

Les microtubules sont impliqués dans le trafic à partir et vers les plaques d’adhérence. Par exemple la sécrétion coordonnée et le recyclage des intégrines est important pour la migration cellulaire (Bretscher 1989). Les intégrines sont internalisées et transportées soit vers les endosomes primaires (voie de recyclage rapide) ou vers le compartiment périnucléaire (longue voie de recyclage) (Caswell et al., 2009b; Arjonen et al., 2012). Les vésicules contenant les intégrines recyclées sont ensuite re-exocytées au front de migration et ré-utilisées pour former de nouveaux sites d’adhésion (Gu et al., 2011). Les microtubules peuvent capturer les vésicules bourgeonnantes à la membrane plasmique pour

faciliter leur transport vers l'extrémité "négative" (Lomakin et al., 2009) ou contribuer à l'exocytose des vésicules arrivant à l'extrémité "plus".

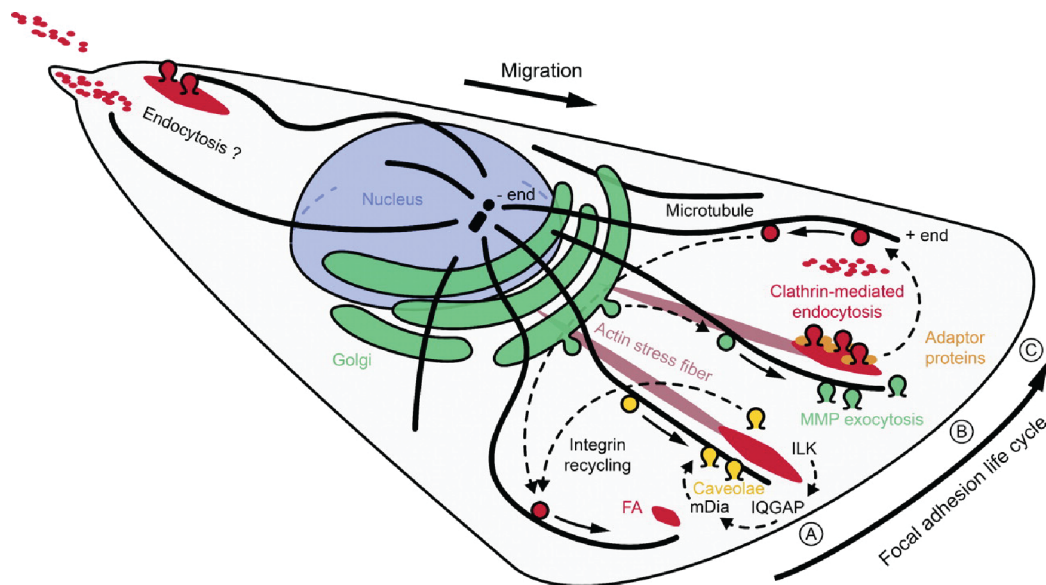


FIGURE 3.7 – Le trafic vésiculaire via les microtubules est impliqué dans la dynamique des plaques d'adhérence

A. ILK participe à la stabilisation des microtubules au front de migration, et est requis pour le transport de caveoline vers les sites d'adhésion. **B.** L'exocytose de MT1-MMP participe à la dégradation de la matrice extra-cellulaire au niveau des plaques d'adhérence. Le transport de MT1-MMP se fait via les microtubules, et la dégradation de la matrice extra-cellulaire pourrait initier le désassemblage des plaques d'adhérence. **C.** Les intégrines sont internalisées via différentes voies d'endocytose. L'endocytose via la clathrine semble être impliquée dans le recyclage des intégrines actives tandis que la voie indépendante de la clathrine recyclerait les intégrines inactives. D'après (Stehbens and Wittmann, 2012)

D'autre part, afin de favoriser le trafic polarisé des vésicules, il est important de contrôler les moteurs moléculaires associés aux microtubules. Soit en régulant leur activité, c'est à dire l'interaction entre le moteur et le cargo ou en assurant des voies préférentielles pour des moteurs spécifiques. Par exemple, le transport le long des microtubules dépendant de la kinésine-1 est important lors de la dynamique des plaques d'adhérence (Krylyshkina et al., 2002) et la kinésine-1 a plus d'affinité pour les microtubules acétylés (Hammond et al., 2010; Reed et al., 2006) ce qui suggère que le transport dépendant des kynésines, de composant et de protéines modulant la dynamique des plaques d'adhérence, pourrait être régulé par les modifications post-traductionnelles. L'inhibition de

la désacétylase HDAC6, induit une hyperacétylation des microtubules. Dans les cellules traitées avec cet inhibiteur, les plaques d'adhérence ont une dynamique plus lente ainsi qu'une migration ralentie (Tran et al., 2007). Les modifications de la tubuline peuvent aussi réguler indirectement l'attachement des moteurs et le trafic des intégrines en modulant l'interaction des MAPs avec les microtubules (Seitz et al., 2002; Siegrist and Doe, 2007).

En résumé,

- Les microtubules sont essentiels durant la migration cellulaire et particulièrement chez les astrocytes où une légère perturbation du réseau de microtubules inhibe la migration cellulaire. Les microtubules contribuent à la régulation de la migration cellulaire en régulant la formation de la protrusion cellulaire ainsi que la mise en place de la polarité de la cellule.
- Les microtubules participent à la régulation de la dynamique des plaques d'adhérence via une association directe ou en régulant le trafic vers et à partir des contacts focaux

Deuxième partie

Objectifs

<p>Caractériser le rôle de la polyglutamylation dans la mise en place de la polarité cellulaire</p>
--

Les microtubules neuronaux présentent un niveau élevé de polyglutamylation (Audebert et al., 1994). Cette modification est aussi observée au niveau des axonèmes dans les cils et les flagelles ainsi que sur les centrioles, composants des centrosomes (Bobinnec et al., 1998). La fonction de cette modification est encore mal caractérisée, mais elle pourrait en particulier moduler les interactions des microtubules avec leur protéines associées et les moteurs moléculaires (Bonnet et al., 2001).

Question 1 : Peut-on observer des microtubules polyglutamylés dans d'autres cellules neuronales, comme les astrocytes ?

Question 2 : si oui, la polyglutamylation a-t-elle un effet sur la structure et/ou la dynamique des microtubules dans les astrocytes ?

Question 3 : La polyglutamylation pourrait-elle jouer un rôle dans les réarrangements des microtubules dans les cellules en migration et dans l'orientation du réseau de microtubules et du centrosome ?

<p style="text-align: center;">Caractériser le rôle de la détyrosination et de l'acétylation dans la régulation des microtubules durant la migration astrocytaire</p>
--

L'acétylation et la détyrosination sont généralement observées au niveau des microtubules dits "stables", particulièrement dans les neurones mais aussi dans les fibroblastes en migration. Certaines études ont montré que la détyrosination et l'acétylation contribueraient à la régulation des moteurs moléculaires associés aux microtubules ainsi qu'à la régulation de la migration comme par exemple durant le développement du cortex cérébral (Li et al., 2012a) ou durant l'invasion de cellules cancéreuses (Castro-Castro et al., 2012; Boggs et al., 2015).

Question 1 : Quel est le niveau de détyrosination et d'acétylation des microtubules dans les astrocytes ?

Question 2 : Ces modifications contribuent-elles à la régulation de la migration astrocytaire dirigée ?

Caractériser le rôle de l'acétylation dans la fonction des microtubules durant la migration astrocytaire

Au cours de ma thèse, j'ai montré que l'acétylation des microtubules contribue à la régulation de la migration astrocytaire. L'objectif a donc été de caractériser le mécanisme par lequel l'acétylation des microtubules régule la migration des astrocytes.

Les astrocytes migrent de manière collective. Les microtubules contribuent à la régulation de la dynamique des jonctions adhérentes et des plaques d'adhérence, nécessaires à la migration dirigée du groupe de cellules. Il a aussi été démontré qu'en présence d'un inhibiteur d'HDAC6, les plaques d'adhérence ont une dynamique plus lente ainsi qu'une migration ralentie (Tran et al., 2007) et que la suppression d' α TAT1 perturbe l'inhibition de contact (Aguilar et al., 2014).

Question 1 : L'acétylation des microtubules contribue-t-elle à la régulation de la dynamique des jonctions adhérentes et/ou des plaques d'adhérence ?

Question 2 : La régulation de la migration astrocytaire est-elle dépendante du niveau d'acétylation ou des enzymes spécifiques impliquées dans cette modification ?

<p style="text-align: center;">Déterminer le mécanisme moléculaire contribuant à la régulation de la dynamique des plaques d'adhérence par l'acétylation des microtubules</p>
--

L'acétylation des microtubules par α TAT1 contrôle la migration astrocytaire en régulant la dynamique des plaques d'adhérence. Sachant que les mécanismes contrôlant la dynamique des plaques d'adhérence sont très variés (cf Introduction chapitre 3) et encore mal caractérisés au cours de la migration, j'ai par la suite, voulu identifier les mécanismes moléculaires contribuant à la régulation de la dynamique des plaques d'adhérence par α TAT1.

Je me suis plus particulièrement attachée à l'étude du trafic membranaire à proximité des plaques d'adhérence car les localisations d' α TAT1 et de l'acétylation suggèrent un effet sur la fonction des microtubules.

Question 1 : L'acétylation régule-t-elle la localisation des microtubules à proximité des plaques d'adhérence ?

Question 2 : L'acétylation des microtubules régule-t-elle le trafic vésiculaire vers/à partir des plaques d'adhérence ?

Troisième partie

Résultats

1

Étude du rôle de la polyglutamylation dans le contrôle de la polarité cellulaire

Durant ma thèse, j'ai étudié le rôle des modifications post-traductionnelles dans la régulation des microtubules dans des astrocytes primaires de rat à l'aide d'un test de blessure, détaillé dans le chapitre 1.

Pour rappel, la polyglutamylation est l'ajout réversible de chaînes latérales protidiques sur la queue carboxy-terminale de la tubuline. La longueur des chaînes latérales peut varier de 1 à 20 unités de glutamate permettant ainsi de générer divers signaux à partir d'un site unique de modification.

Les chaînes latérales de glutamate sont synthétisées en deux étapes distinctes. La première étape, l'initiation, est l'ajout d'un résidu glutamate par formation d'une liaison covalente entre le groupement amine et le groupement carboxyle γ d'un résidu glutamate modifié et situé à l'extrémité carboxy-terminale de la tubuline. Les réactions suivantes d'élongation sont responsables de la formation des chaînes latérales de glutamate.

Les enzymes qui catalysent la formation des chaînes latérales de glutamate font partie de la famille des Tubuline Tyrosine Ligase-Like (TTLLs). La polyglutamylation est une réaction enzymatique réversible. Les enzymes qui catalysent la suppression d'un ou plusieurs résidus glutamate sont les carboxypeptidases (CCPs).

Les polyglutamylases et les carboxypeptidases possèdent une spécificité de substrat entre les sous-unités α et β de la tubuline. Certaines de ces enzymes possèdent aussi une spécificité de réaction. En effet certaines polyglutamylases ont une activité initiatrice tandis que d'autres ont

une activité élongatrice.

Pour permettre l'étude de la polyglutamylation dans les astrocytes et mettre en évidence les différences de phénotypes durant la mise en place de la polarité et de la migration, j'ai utilisé différents anticorps reconnaissant spécifiquement la (poly)glutamylation mais de longueurs différentes (Figure 1.1).

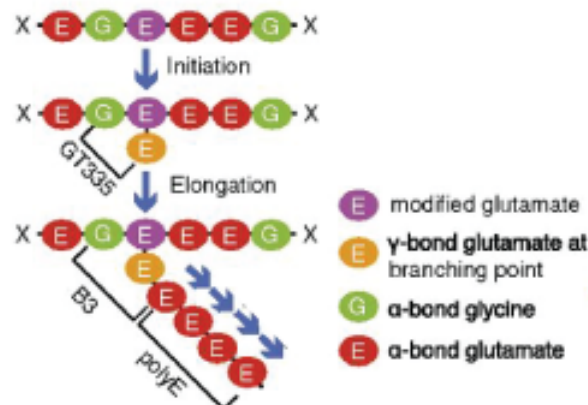


FIGURE 1.1 – **Anticorps reconnaissant spécifiquement la polyglutamylation**
 Diagramme schématique de la polyglutamylation. Le schéma indique les épitopes reconnus par les anticorps GT335, B3 et PolyE (Sun et al., 2016).

L'anticorps commercial GT335 reconnaît spécifiquement la polyglutamylation située sur les sous-unités α et β de la tubuline, sans distinction de longueur de chaîne. Celui-ci permet d'observer la présence de polyglutamylation sur les microtubules (Figure 1.1) (Wolff et al., 1992). L'anticorps PolyE (RpE) permet de reconnaître spécifiquement les chaînes latérales de glutamate possédant au moins deux motifs (Figure 1.1) (Shang et al., 2002). R17 et R20 reconnaissent respectivement les mono et biglutamylation. PolyE, R17 et R20 proviennent du laboratoire de Carsten Janke et nous apportent une information sur la longueur des chaînes latérales de polyglutamylation de la tubuline.

1.1 Localisation de la (poly)glutamylation dans les astrocytes normaux en migration

Afin d'étudier le rôle de la polyglutamylation dans la régulation des microtubules dans les astrocytes, j'ai dans un premier temps observé

présence et la localisation de la polyglutamylation dans les astrocytes en migration. A l'aide des différents anticorps, j'ai analysé les différentes longueurs de chaînes présentes dans les astrocytes.

Les astrocytes sont cultivés sur des lamelles de verre recouvertes de poly-ornithine jusqu'à obtention d'une monocouche. J'ai effectué un test de blessure et les astrocytes sont fixés après 8h de migration. Un protocole de fixation spécifique a été utilisé afin de préserver au maximum les modifications de la tubuline (Bell and Safiejko-Mroccka, 1995; Magiera and Janke, 2013). Au cours de la migration des astrocytes, j'ai observé un faible niveau de polyglutamylation des microtubules. Mais il existe une différence de taille des chaînes latérales de glutamylation en fonction de la localisation cellulaire. En effet, le réseau de microtubules semble être essentiellement mono et biglutamylé d'après les immunomarquages des anticorps R17 et R20 (Figure 1.2). L'observation des immunomarquages avec les anticorps PolyE et GT335 indiquent que les chaînes latérales longues sont présentes uniquement au niveau du cil primaire (Figure 1.2). Celui-ci ne présente pas d'immunomarquage avec R17 et ne semble donc pas monoglutamylé (Figure 1.2).

En utilisant les différents anticorps reconnaissant spécifiquement différentes longueurs de chaînes latérales, j'ai observé qu'il n'y avait pas de monoglutamylation au niveau du cil primaire dans les astrocytes. Les chaînes latérales présentes au niveau de la queue carboxy-terminale des tubulines présentes au niveau du cil primaire possèdent au moins deux résidus glutamate.

1.1 Localisation de la (poly)glutamylation dans les astrocytes normaux en migration

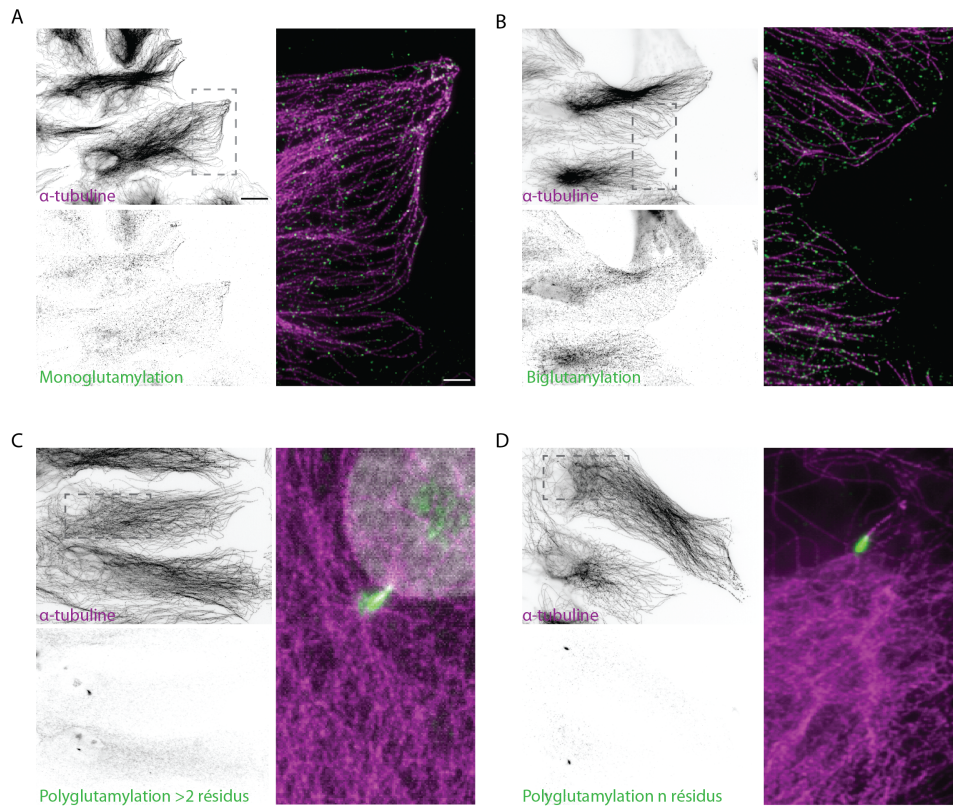


FIGURE 1.2 – Profil d’expression de la glutamylation dans les astrocytes à 8h de migration

Immunomarquage d’astrocytes fixés après 8h de migration. Un protocole de fixation spécifique a été utilisé afin de préserver au maximum les modifications de la tubuline (Bell and Safiejko-Mroccka, 1995; Magiera and Janke, 2013). Les images à gauche sont en contraste inversé pour chaque canal. **A.** Microtubules (magenta) monoglutamylés (vert) dans des astrocytes en migration. **B.** Microtubules (magenta) biglutamylés (vert). **C.** Microtubules (magenta) polyglutamylés (vert), dont les chaînes latérales possèdent au moins deux résidus, dans des astrocytes en migration. **D.** Microtubules (magenta) polyglutamylés (vert), sans distinction de longueur de chaîne, dans des astrocytes en migration. Barre d’échelle pour chaque image en contraste inversé 10 μ m. Barre d’échelle des zooms 2 μ m

1.2 Étude du rôle de la polyglutamylation dans la polarité des astrocytes

Le niveau de polyglutamylation du réseau de microtubules dans les astrocytes est faible et cette modification est essentiellement présente au niveau du cil primaire, structure situé au niveau du centrosome. Pour cette raison, j'ai entrepris d'étudier le rôle potentiel rôle de la polyglutamylation dans la mise en place de polarité des astrocytes.

1.2.1 Test de polarité

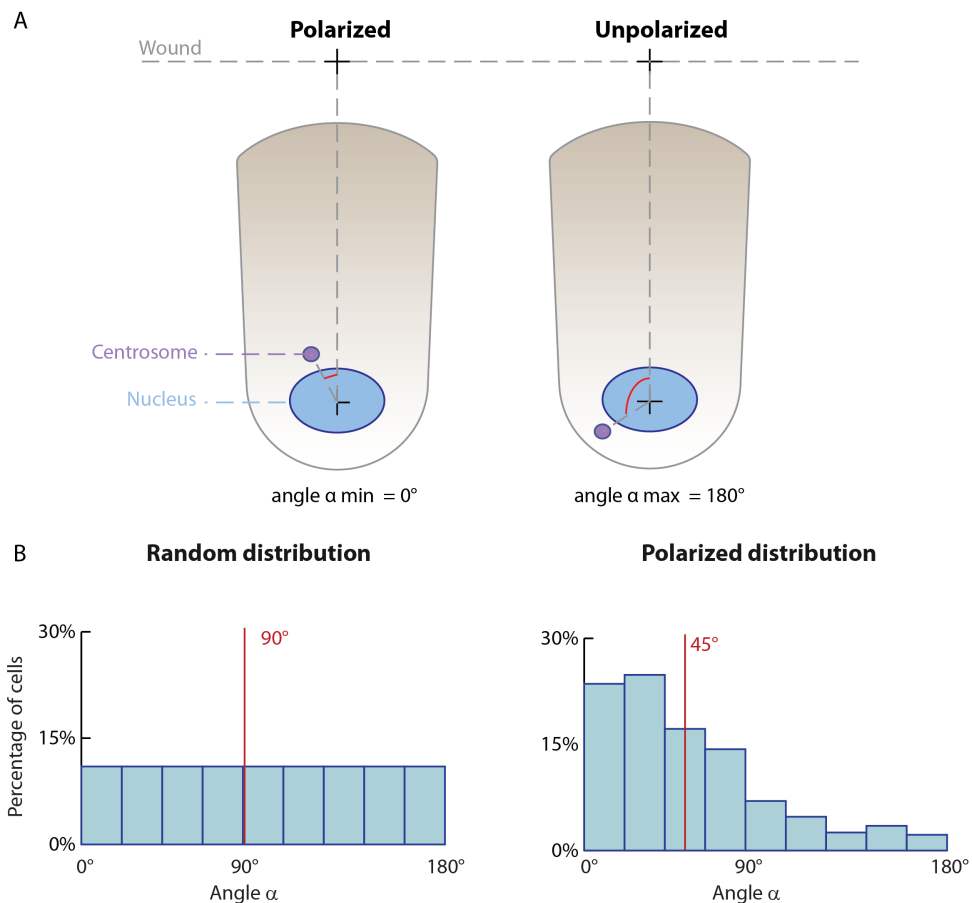


FIGURE 1.3 – Méthode d'étude de la polarité dans les astrocytes

A. Méthode de mesure de l'orientation de l'axe noyau-centrosome dans les astrocytes en migration. **B.** Microtubules (magenta) biglutamylés (vert) dans des astrocytes en migration. **C.** Exemple de distribution théorique d'angles (α) en degré pour une population d'astrocytes si le positionnement du centrosome est considéré comme aléatoire (gauche) ou pour une population d'astrocytes avec un centrosome polarisé (droite).

Afin de quantifier l'axe noyau-centrosome, nous mesurons l'angle formé entre la droite passant par le centre du noyau et le centre du centrosome avec la droite passant par le centre du noyau et perpendiculaire à la blessure (Figure 1.3.A). L'angle α formé par ces deux droites peut prendre une valeur entre 0 et 180 degrés. Si le positionnement du centrosome par rapport au noyau est aléatoire, alors la valeur médiane pour une population d'astrocytes donnée est de 90 degrés (Figure 1.3.B) Dans une population d'astrocytes polarisés (contrôle), la médiane est de 45 degrés, ce qui indique une orientation préférentielle du centrosome devant le noyau, orienté vers le front de migration (Dupin et al., 2009)

1.2.2 L'inhibition de la polyglutamylation par déplétion d'une glutamylase : TTLL1

Afin d'identifier le rôle de la polyglutamylation dans la mise en place de la polarité et la migration astrocytaire, j'ai inhibé l'expression des enzymes responsables de cette modification et observé qu'elles étaient les conséquences sur la régulation de ces processus.

Il n'existe pas de drogues inhibant ces enzymes, j'ai donc utilisé des siARN pour inhiber l'expression des glutamylases. Pour cela, j'ai tout d'abord étudié les caractéristiques des différentes enzymes impliquées dans la polyglutamylation. J'ai choisi de cibler TTLL1. Elle fonctionne en coopération avec les autres glutamylases. Il s'agit aussi de l'enzyme la mieux caractérisée parmi la famille des TTLLs (Regnard et al., 2003). La transfection des astrocytes avec un deux siRNA ciblant TTLL1 induit une meilleur déplétion que l'utilisation de chaque siRNA séparément, comme l'indique l'analyse quantitative par western blot (Figure 1.4).

J'ai analysé l'orientation des centrosomes dans les astrocytes transfectés avec un siRNA ciblant la GFP, utilisés comme contrôle et ceux transfectés avec un siRNA ciblant TTLL1 (siTTLL1). Je n'ai pas observé d'effet de la déplétion de l'enzyme TTLL1 sur la mise en place de la polarité astrocytaire (Figure 1.4).

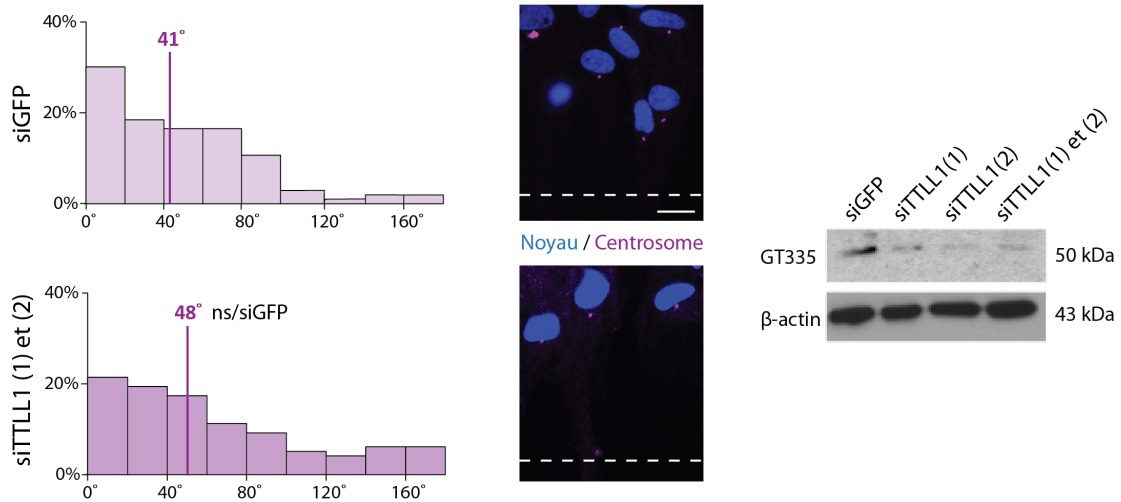


FIGURE 1.4 – **La déplétion de TLL1 n’affecte pas la polarité du centrosome**
A. Distribution des valeurs prises par l’angle entre l’axe centrosome-noyau et l’axe perpendiculaire au wound partant du centre du noyau. La médiane est indiquée par la barre verticale en violet (N=3 avec >100 cellules par expérience / test de wilcoxon). **B.** Immunofluorescence d’astrocytes à 8h de migration. Noyau en bleu et centrosome en magenta. Barre d’échelle 10 μ m **C.** Western blot montrant le niveau de polyglutamylation dans des astrocytes controles et en présence de siARN ciblant TLL1.

1.3 Etude du role du cil primaire dans la polarité cellulaire

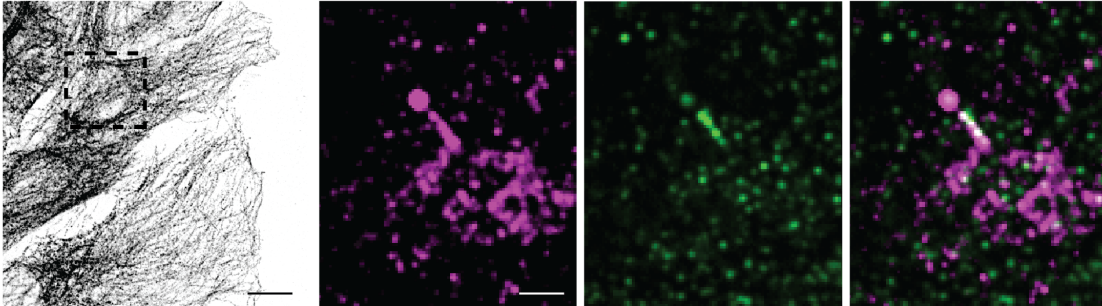
1.3.1 Le cil primaire est polarisé durant la migration des astrocytes

La polyglutamylation est impliquée dans l’assemblage et la maintenance du cil (Wloga and Gaertig, 2010). Il a été démontré que le cil primaire est orienté parallèlement au sens de migration dans les fibroblastes et les cellules du muscle lisse (Schneider et al., 2009). La polyglutamylation est principalement localisée au niveau du cil primaire dans les astrocytes (Figure 1.5). J’ai entrepris d’étudier le rôle potentiel de la polarité du cil primaire lors de la migration astrocytaire et le rôle de la polyglutamylation sur la maintenance du cil durant la migration.

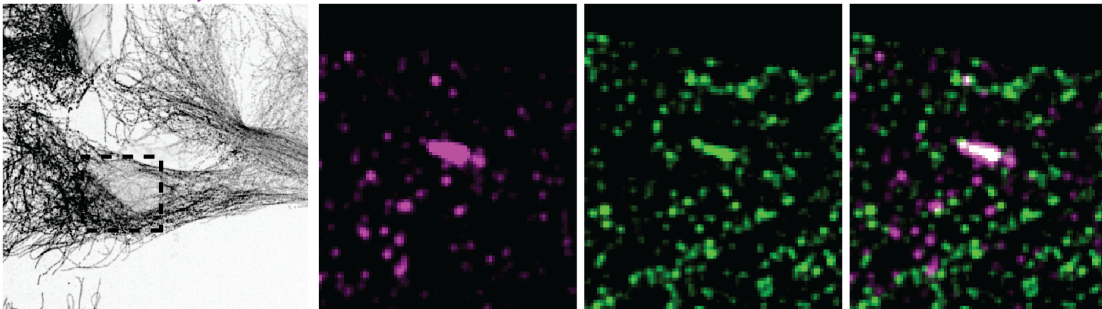
Le cil primaire des astrocytes est fortement glutamylé (Figure 1.5). Les chaînes latérales possèdent au moins deux résidus glutamate (Figure

1.5.B et C) et l'ensemble du cil est glutamylé comme l'indique le marquage du cil avec l'anticorps Arl13b, protéine spécifique du cil primaire, et l'anticorps GT335 (Figure 1.5.A). On peut observer que le corps basal du cil est biglutamylé (Figure 1.5.C), mais ne possède pas de chaînes latérales de glutamate possédant plus de deux résidus (Figure 1.5.B).

A Microtubules / Arl13b / GT335



B Microtubules / PolyE / GT335



C Microtubules / R20 / GT335

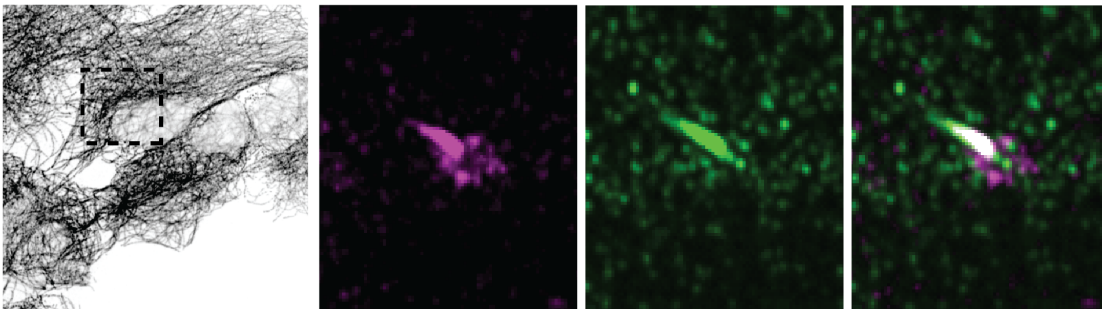


FIGURE 1.5 – Profil de glutamylation du cil primaire dans les astrocytes
A. Immunofluorescence d'astrocytes. Le cil primaire est marqué en violet avec l'anticorps Arl13b, et la polyglutamylation avec l'anticorps GT335 en vert. **B.** Immunofluorescence d'astrocytes. La polyglutamylation est marquée en violet et en vert respectivement avec les anticorps PolyE et GT335. **C.** Immunofluorescence d'astrocytes. La polyglutamylation est marquée en vert avec l'anticorps GT335 et la biglutamylation en violet avec l'anticorps R20 GT335. Barre d'échelle 10 μ m des images en gris. Barre d'échelle des images à gauche en contraste inversé 10 μ m. Barre d'échelle des zooms 2 μ m

J'ai ensuite étudié la polarité du cil primaire durant la migration. J'ai observé qu'il est orienté parallèlement au sens de migration mais dans la direction opposée, comme le montre l'immunomarquage avec l'anticorps Arl13b (Figure 1.6.A). Le cil primaire étant orienté parallèlement à la direction de la migration, dans le sens inverse, l'angle médian pris par le cil est d'environ 128 (Figure 1.6.B)

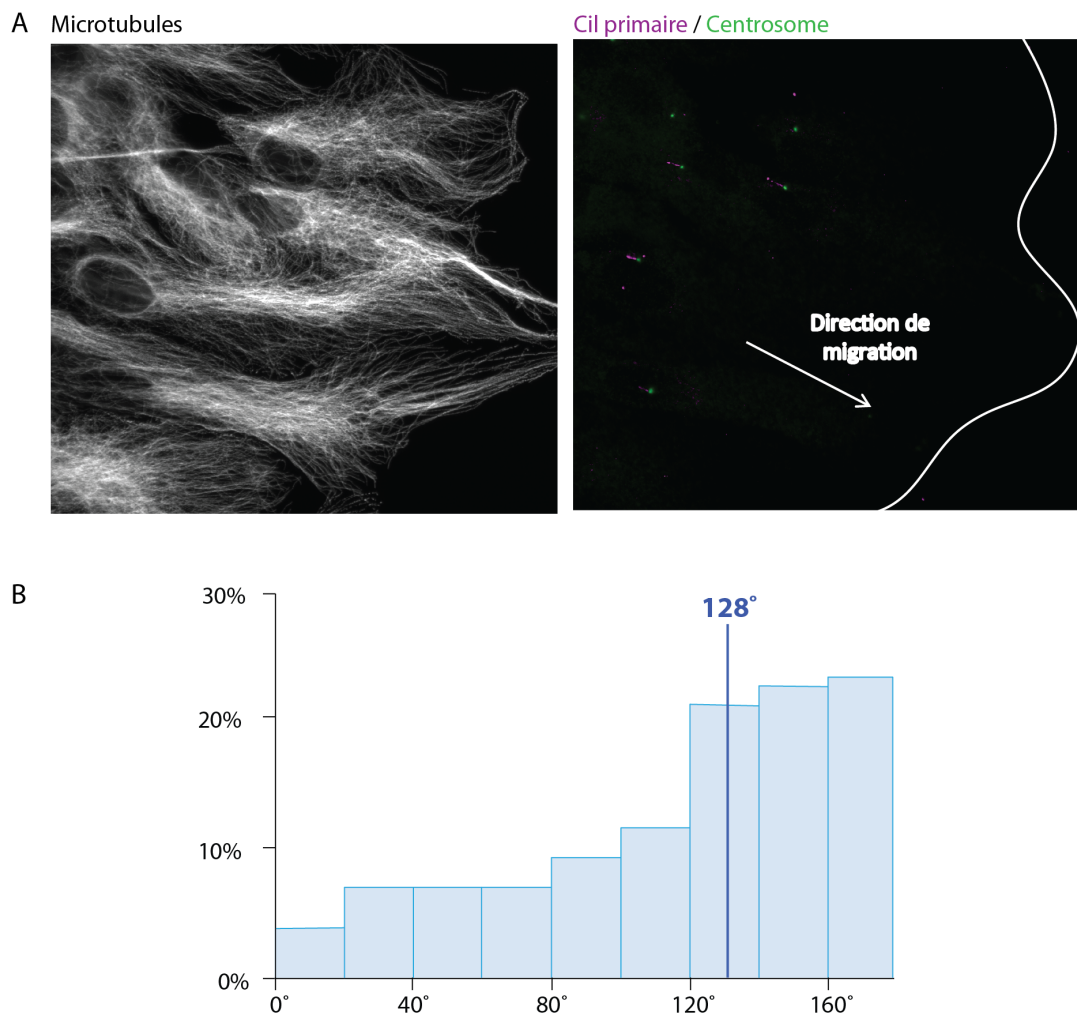


FIGURE 1.6 – Polarité du cil primaire dans les astrocytes en migration

A. Les microtubules en gris indique la direction de l'axe principal de la protrusion. Le cil primaire et le centrosome sont respectivement marqués avec les anticorps Arl13b (en violet) et γ -tubuline (en vert). la ligne blanche indique le front de migration des astrocytes. Barre d'échelle : $10\mu\text{m}$. **B.** Distribution des valeurs prises par l'angle entre l'axe centrosome-cil primaire et l'axe perpendiculaire à la blessure partant du centre du noyau. La médiane est indiquée par la barre verticale en violet (n=3, 100 cellules par expérience).

1.3.2 La déplétion de TTLL1 n'induit pas de défaut de polarité du cil primaire dans les astrocytes en migration

Le cil primaire est la principale structure polyglutamylée dans les astrocytes et celui-ci est polarisé durant leur migration. J'ai étudié si la déplétion de TTLL1 influençait la polarisation du cil primaire durant la migration. Je n'ai pas observé de différence d'orientation du cil primaire après déplétion de TTLL1 dans les astrocytes comme l'indique l'angle médian (Figure 1.7.A) et l'immunomarquage du cil primaire avec Arl13b (Figure 1.7.B).

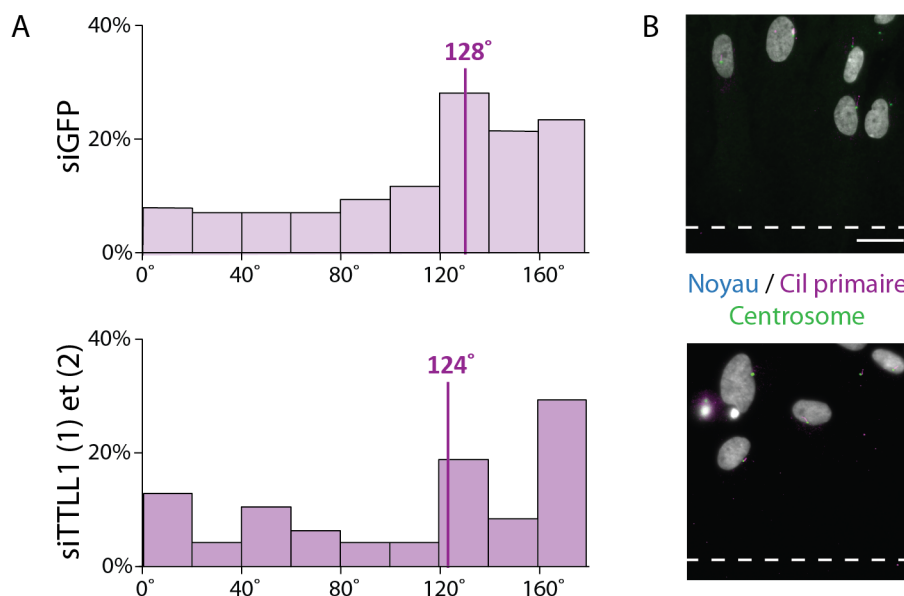


FIGURE 1.7 – La déplétion de TTLL1 n'affecte pas l'orientation du cil primaire

A. Distribution des valeurs prises par l'angle entre l'axe centrosome-cil primaire et l'axe perpendiculaire au wound partant du centre du noyau. La médiane est indiquée par la barre verticale en violet. **B.** Immunofluorescence d'astrocytes à 8h de migration. Noyau en gris, centrosome en vert et cil primaire en violet. La ligne pointillée indique la direction de blessure effectuée sur la monocouche. Barre d'échelle $10\mu\text{m}$. (n=3 100 cellules par conditions, test de Wilcoxon).

1.3.3 La sur-expression de la carboxypeptidase CCP5 n'a pas d'effet sur la polarité du centrosome dans les astrocytes

Afin de confirmer les résultats obtenus précédemment, j'ai diminué le niveau de polyglutamylation dans les astrocytes en sur-exprimant

une carboxy-peptidase. La glutamylation est une réaction enzymatique réversible. J'ai choisi de sur-exprimer la carboxy-peptidase 5 (CCP5) qui clive spécifiquement les résidus glutamates situés au niveau des carboxyles α de l' α -tubuline et clive les résidus glutamates des chaînes latérales de l' α et de la β -tubuline.

J'ai sur-exprimé la forme sauvage et la forme mutée, comme contrôle, de CCP5. On observe une diminution du niveau de glutamylation dans les astrocytes après sur-expression de la forme sauvage de CCP5, comme l'indique l'analyse quantitative par western blot (Figure 1.8.B). On observe aussi sur l'immunomarquage des astrocytes une diminution du niveau de polyglutamylation des astrocytes après sur-expression de CCP5 (Figure 1.8.A).

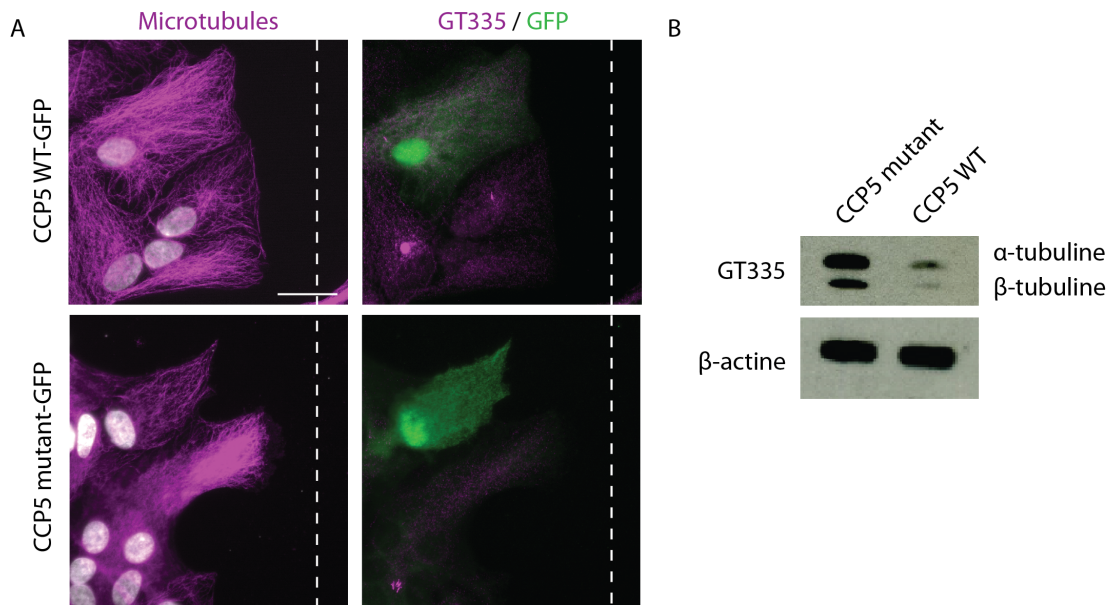


FIGURE 1.8 – La sur-expression de CCP5 n'a pas d'effet sur la polarité du centrosome

A. Immunofluorescence d'astrocytes en migration à 8h. **B.** Western blot indiquant la diminution du niveau de polyglutamylation après sur-expression de CCP5 WT-GFP. Barre d'échelle 10 μ m.(n=3, 100 cellules par expérience, test de Wilcoxon)

L'inhibition de la polyglutamylation par sur-expression de CCP5 n'a pas d'effet sur la mise en place de la polarité du centrosome lors de la migration des astrocytes comme l'indique la distribution des valeurs prises par l'angle noyau-cil primaire (Figure 1.9.A) et l'immunomarquage du centrosome (Figure 1.9.B) où l'on peut observer

la localisation du centrosome à l'avant du noyau, vers le front de migration, dans les cellules marquées par la GFP.

1.3.4 La sur-expression de CCP5 n'a pas d'effet sur la polarité du cil primaire

J'ai effectué la même analyse d'angle avec les cils primaires dans les cellules sur-exprimant CCP5. Je n'ai pas observé d'effet de la diminution du niveau de polyglutamylation, induit par la sur-expression de CCP5, sur l'orientation du cil primaire comme l'indique la distribution des valeurs prises par l'angle noyau-cil primaire (Figure 1.10).

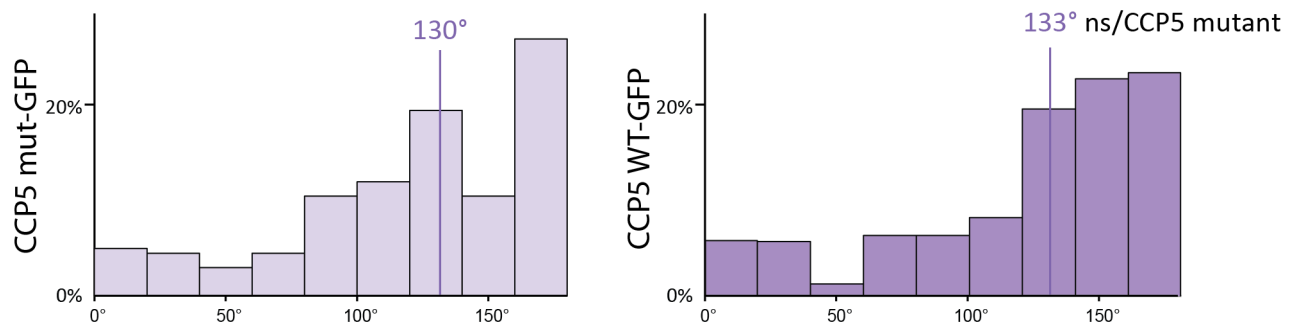


FIGURE 1.9 – La sur-expression de CCP5 n'a pas d'effet sur la polarité du cil primaire

A. Distribution des valeurs prises par l'angle entre l'axe noyau-cil primaire et l'axe perpendiculaire à la blessure passant par le centre du noyau. La médiane est indiquée par la barre verticale en violet. (n=3, 100 cellules par expérience, test de Wilcoxon).

En résumé,

- Dans les astrocytes en migration, les microtubules présentent un niveau faible de polyglutamylation. La structure principalement polyglutamylée est le cil primaire.
- Le cil primaire est polarisé, en sens inverse de la direction de migration.
- La diminution du niveau de polyglutamylation n'a pas d'effet sur l'orientation du centrosome et du cil primaire dans les astrocytes en migration.

2

Les niveaux d'acétylation et de détyrosination des microtubules régulent la vitesse de migration des astrocytes

2.1 L'acétylation et la détyrosination des microtubules durant la migration astrocytaire

Après avoir étudié le rôle de la polyglutamylation dans la mise en place de la polarité dans les astrocytes, je me suis intéressée au rôle potentiel de l'acétylation et de la détyrosination des microtubules au cours de la migration. Ces deux modifications, généralement observées au niveau des microtubules dits "stables" et âgés, ont déjà fait l'objet de nombreuses études. Leur contribution dans la régulation de la migration de certains types cellulaires, tels que les cellules mammaires cancéreuses, a déjà été démontré (Valenzuela-Fernández et al., 2008; Castro-Castro et al., 2012). Cependant, les mécanismes moléculaires impliqués n'ont pas été identifiés.

Afin d'étudier la fonction de ces modifications dans la régulation du cytosquelette de microtubules, j'ai dans un premier temps étudié la localisation de ces deux modifications.

Lors de leur migration, les astrocytes forment une protrusion orientée dans la direction de la migration et riche en microtubules (Figure 2.1). L'immunomarquage des microtubules montre, à 8h de migration, que le réseau est lui aussi polarisé et le noyau se situe à l'arrière de la cellule. Les immunomarquages de microtubules acétylés (Figure 2.1.A) et détyrosinés (Figure 2.1.B) indiquent que le réseau de microtubules n'est pas modifié dans sa totalité. En effet, le réseau de microtubules localisé autour du noyau et au niveau du centrosome présente un niveau

2.1 L'acétylation et la détyrosination des microtubules durant la migration astrocytaire

élevé d'acétylation et de détyrosination (Figure 2.1), tandis que les microtubules situés au front de migration semblent être moins modifiés. On peut observer que ces deux modifications semblent être présentes au niveau de la même sous-population de microtubules (Figure 2.1).

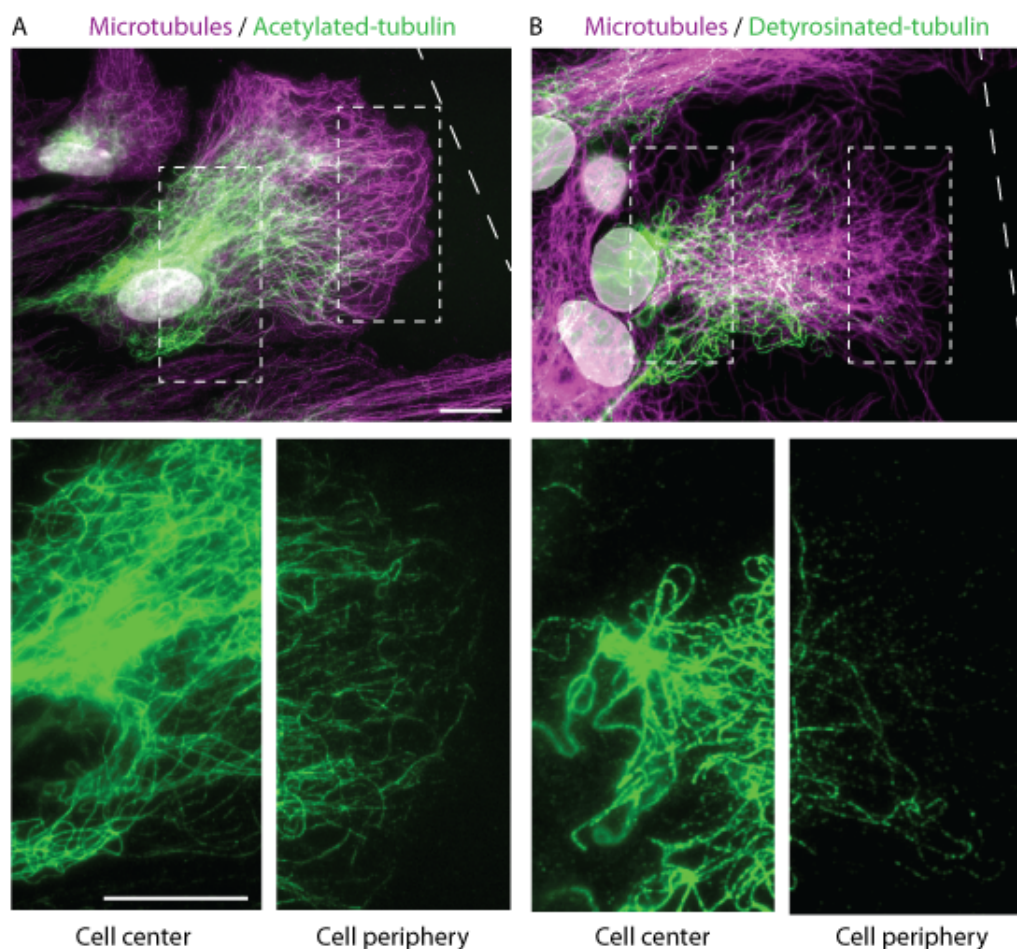


FIGURE 2.1 – L'acétylation et la détyrosination des microtubules

Les astrocytes primaires de rat ont été cultivés sur des lamelles de verre recouvertes de poly-L-ornithine jusqu'à obtention d'une monocouche. Un test de blessure a été effectué. Les astrocytes ont été fixés avec du méthanol après 8h de migration. Immunomarquage des microtubules en magenta et des différentes modifications post-traductionnelles en vert : L'acétylation de la lysine 40 de l' α -tubuline (**A**) et la détyrosination de l' α -tubuline (**B**). Les agrandissements des images **A** et **B**, situés en dessous de celles-ci montrent le marquage de l'acétylation et de la détyrosination au centre de la cellule et à la périphérie. La ligne pointillée indique l'axe de la blessure effectuée sur la monocouche. Les carrés en pointillé indiquent les zones agrandies. Barre d'échelle 10 μ m.

2.2 Diminution des niveaux d'acétylation et de détyrosination des microtubules en ciblant les enzymes impliquées dans ces modifications

Afin de déterminer si ces deux modifications contribuent à la régulation de la migration astrocytaire, j'ai tout d'abord diminué les niveaux d'acétylation et de détyrosination en ciblant les enzymes impliquées dans ces modifications.

2.2.1 La déplétion spécifique de l'acétyl-transférase α TAT1 induit une diminution du niveau d'acétylation des microtubules

Dans le but d'étudier le rôle spécifique de l'acétylation de la lysine 40 de la sous-unité α de la tubuline, j'ai choisi de diminuer le niveau d'acétylation des microtubules en diminuant le niveau d'expression de l'acétyl-transférase α TAT1 à l'aide de siRNA (Figure 2.2.A). J'ai choisi de cibler cette enzyme car elle est spécifique de la lysine 40 de l' α -tubuline et de nombreuses études ont déjà démontré le rôle de la désacétylase HDAC6, l'autre enzyme impliquée dans l'acétylation des microtubules, dans la régulation de la migration cellulaire (Valenzuela-Fernández et al., 2008; Arsenault et al., 2013; Zuo et al., 2012) suggérant que le niveau d'acétylation pourrait jouer un rôle dans la migration (Chapitre 2). De plus, HDAC6 s'est avérée non spécifique de la tubuline et possède de nombreux substrats qui pourraient être impliqués dans la migration astrocytaire (Zhang et al., 2007b).

Dans les astrocytes contrôles (Control), transfectés avec un siRNA ciblant la luciférase, on observe que le réseau de microtubules présente un niveau élevé d'acétylation (Figure 2.2.C). L'utilisation d'une combinaison de deux siRNA (si α TAT1 (1+2)) ciblant spécifiquement α TAT1 (voir tableau siRNA en annexe) permet de diminuer le niveau d'acétylation des microtubules d'environ 70-80%, comme l'indique l'analyse quantitative par western blot (Figure 2.2.B). J'ai confirmé par immunofluorescence la diminution du niveau d'acétylation induite par l'utilisation des siRNA ciblant α TAT1 (Figure 2.2.C). Dans les cellules transfectées avec les siRNA ciblant α TAT1, le niveau d'acétylation

2.2 Diminution des niveaux d'acétylation et de détyrosination des microtubules en ciblant les enzymes impliquées dans ces modifications

est fortement diminué, confirmant les résultats observés par western blot (Figure 2.2.C). On peut aussi observer que le niveau d'acétylation est plus fortement diminué à l'avant tandis qu'une sous-population de microtubules autour du noyau reste acétylé. Cela peut s'expliquer par la forte densité de microtubules à cet endroit rendant difficile l'accès aux désacétylases telles qu'HDAC6.

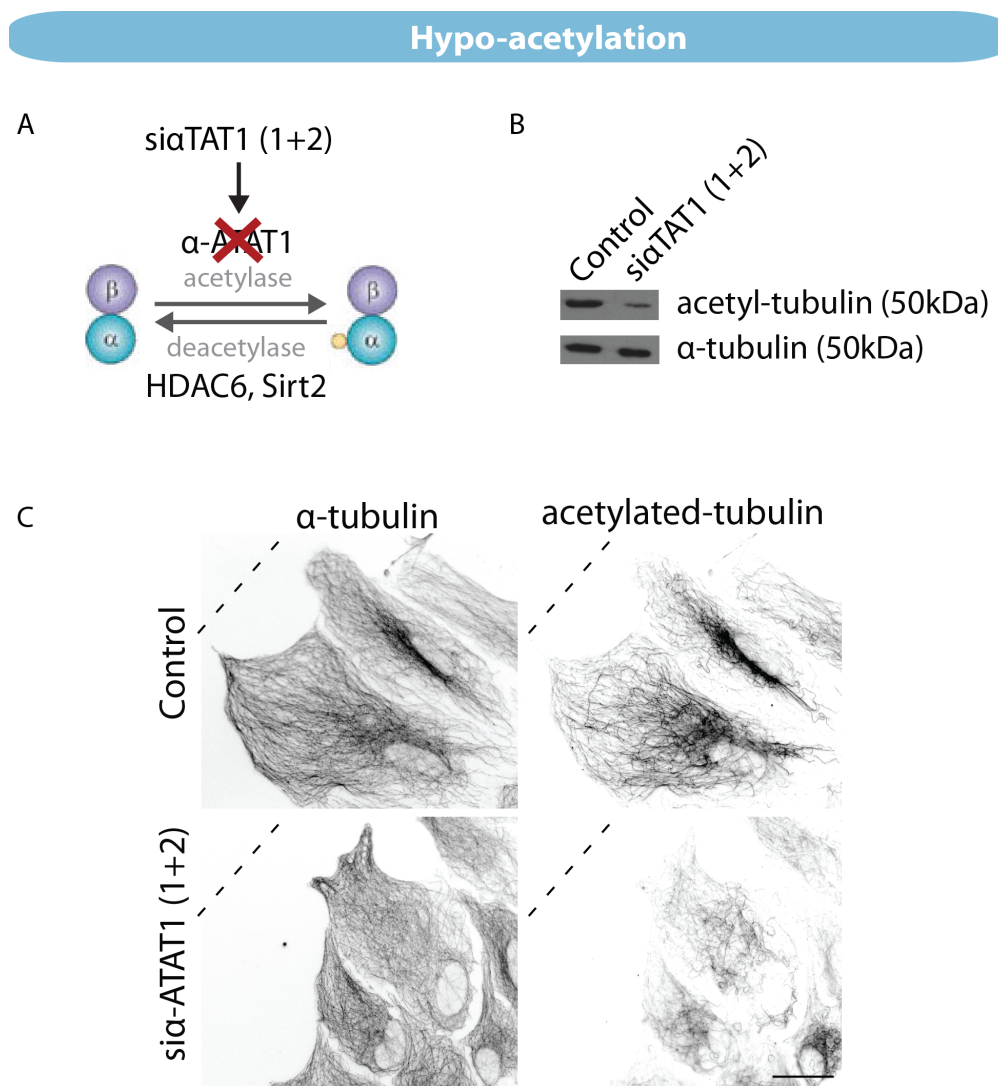


FIGURE 2.2 – Diminution du niveau d'acétylation en ciblant α TAT1
A. Schéma montrant les enzymes responsables de l'acétylation/désacétylation. D'après (?). Afin de diminuer le niveau d'acétylation des microtubules, les astrocytes primaires de rat ont été transfectés avec deux siRNAs ciblant spécifiquement l'acétyl-transférase α TAT1. **B.** Analyse quantitative par western blot du niveau d'acétylation après transfection avec les siRNAs indiqués. L'anti α -tubuline a été utilisé comme contrôle de charge. Résultats obtenus à partir de lysats d'astrocytes primaires 4 jours après transfection avec un siRNA ciblant la luciférase (Control), deux siRNAs ciblant l' α TAT1 (siaTAT1 (1+2)). **C.** Les astrocytes ont été déposés sur des lamelles de verre recouvertes de poly-ornithine jusqu'à ce qu'ils forment une monocouche puis un test de blessure a été effectué. Immunofluorescence des astrocytes primaires de rat après 8h de migration, en contraste de phase et immunomarqué par l'anti α -tubuline et l'anti acétyl-tubuline. La ligne pointillée indique l'orientation de la blessure effectuée sur la monocouche. Barre d'échelle 10 μ m

2.2.2 La sur-expression de la tubuline tyrosine ligase TTL induit une diminution du niveau de détyrosination des microtubules

Afin de diminuer le niveau de détyrosination des microtubules, j'ai sur-exprimé la tubulin-tyrosin ligase (TTL) en transfectant les astrocytes primaires de rat avec un plasmide codant pour cette enzyme (Figure 2.3.A et B). Précédemment dans le laboratoire, Melissa Glatigny stagiaire de M2, a observé que la sur-expression de TTL dans les astrocytes induit une diminution du niveau de détyrosination des microtubules (Figure 2.3.C). Afin d'observer le niveau de détyrosination des microtubules, on utilise un anticorps reconnaissant spécifiquement le résidu de glutamate qui se situe juste avant la tyrosine terminale et qui est mis en évidence lors de la détyrosination des microtubules (Chapitre 2). On peut observer par immunofluorescence, dans les astrocytes contrôles, un marquage élevé de l'anticorps reconnaissant le résidu glutamate ce qui signifie un niveau élevé de détyrosination des microtubules (Figure 2.3.C). Après sur-expression de TTL, on observe une forte diminution du marquage au niveau de la cellule sur-exprimant l'enzyme, ce qui signifie que les microtubules dans cette cellule sont fortement tyrosinés (Figure 2.3.A).

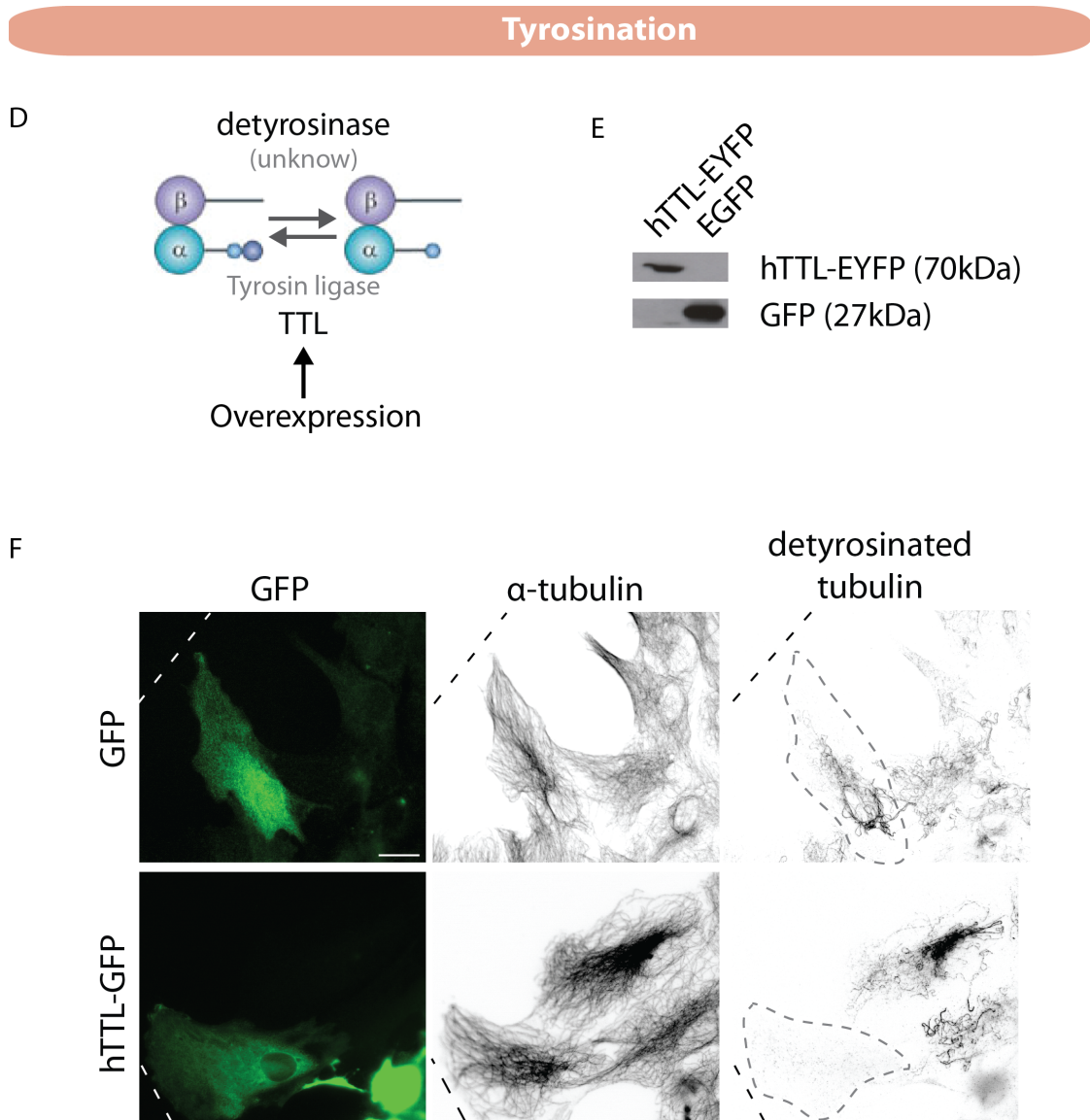


FIGURE 2.3 – Diminution du niveau de détyrosination des microtubules en sur-exprimant TTL

A. Schéma montrant les enzymes responsables de détyrosination/tyrosination. D'après (?). Les astrocytes primaires de rat ont été transfectés avec le plasmide codant pour TTL. **B.** Analyse quantitative par western blot. Résultats obtenus à partir de lysats d'astrocytes primaires 3 jours après transfection avec la GFP (Contrôle) ou TTL (hTTL-GFP). **F.** Immunofluorescence des astrocytes fixés au méthanol après 8h de migration et immunomarqués pour la détyrosination des microtubules et l' α -tubuline en contraste inversé et la GFP. Barre d'échelle $10\mu\text{m}$

2.3 L'acétylation et la détyrosination des microtubules régulent la vitesse de migration des astrocytes

2.3.1 La déplétion spécifique d' α TAT1 induit une diminution de la vitesse de migration des astrocytes

Afin de déterminer si le niveau d'acétylation des microtubules régule la migration astrocytaire, j'ai effectué un test de blessure sur une monocouche d'astrocytes primaires de rat. Pour cela, les astrocytes transfectés avec un siRNA ciblant la luciférase (Control) ou α TAT1 (si α TAT1) sont cultivés sur du plastique recouvert de poly-L-ornithine durant 4 jours afin de permettre la diminution des niveaux d'expression des enzymes ciblées et la réorganisation des astrocytes en monocouche. Lors du test de blessure, la rayure de la monocouche induit une polarisation des astrocytes et une migration dirigée perpendiculaire à la rayure, de manière à refermer la blessure et reformer la monocouche. Afin de suivre cette migration en direct, les astrocytes sont photographiés à intervalle régulier (15min) durant 24h jusqu'à fermeture de la blessure et reformation de la monocouche (Figure 2.4.A). On observe que les astrocytes migrent collectivement perpendiculairement à la blessure effectuée horizontalement. La ligne grise indique la position des astrocytes à t_0 , moment où la blessure a été effectuée. L'image représente la position des astrocytes après 16h de migration. A 16h, les astrocytes transfectés avec le siRNA ciblant α TAT1 ont migré moins loin que les astrocytes contrôles (Figure 2.4.A).

L'analyse de ces expériences m'a permis d'observer une diminution de la vitesse de migration des astrocytes après diminution du niveau d'expression de l'acétyl-transférase α TAT1 (Figure 2.4.B). Les astrocytes contrôle migrent à une vitesse d'environ $0.2\mu\text{m}/\text{min}$ tandis que les astrocytes transfectés avec le si α TAT1 migrent à une vitesse d'environ $0.15\mu\text{m}/\text{min}$.

L'analyse de la directionnalité de la migration permet d'évaluer si les astrocytes migrent perpendiculairement à la blessure. La persistance de migration permet d'évaluer la capacité des astrocytes à conserver la même direction de migration. Je n'ai pas observé de perturbation

Chapitre 2. Les niveaux d'acétylation et de détyrosination des microtubules régulent la vitesse de migration des astrocytes de la directionnalité et de la persistance de migration (Figure 2.4.B).

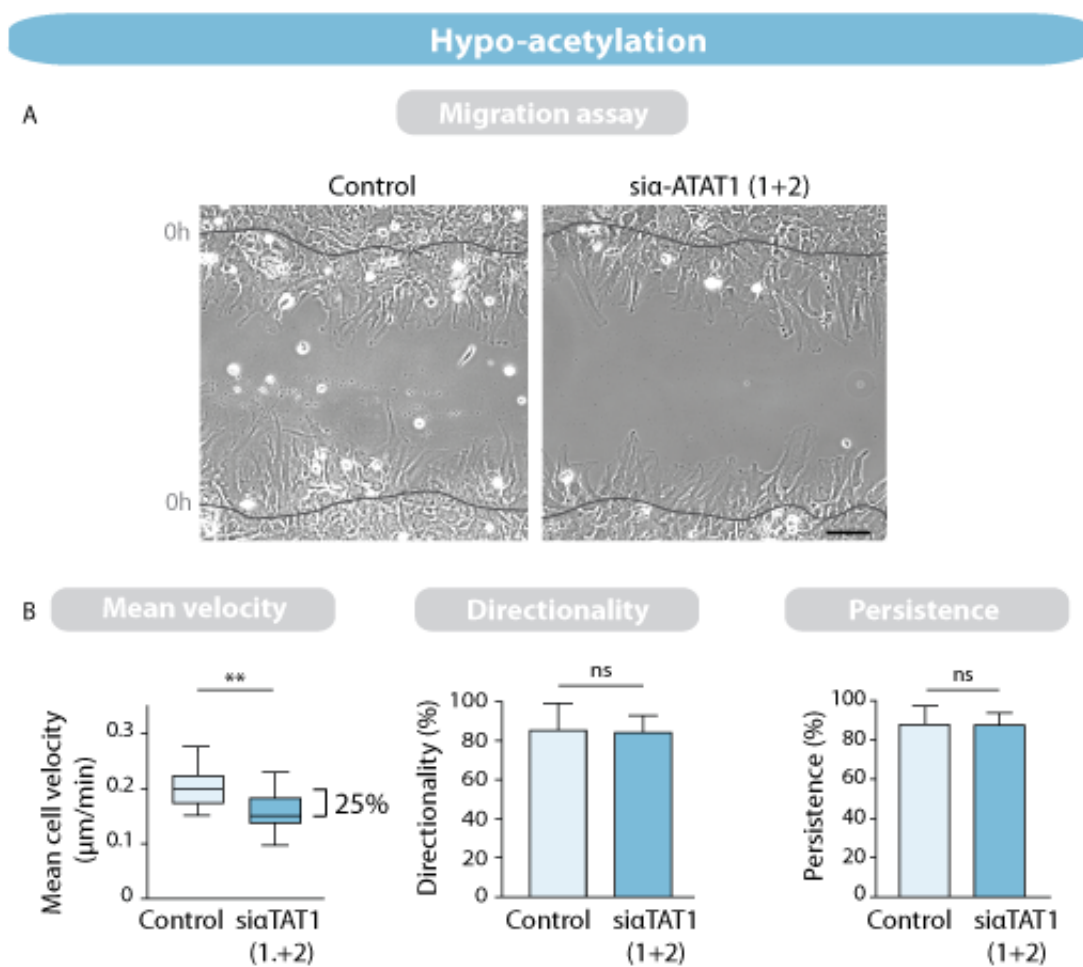


FIGURE 2.4 – Le niveau d'acétylation des microtubules régule la vitesse de migration des astrocyte

Les astrocytes sont photographiés à intervalle régulier (15min) durant 24h. **A.** Photographie prise à 16h de migration. Les lignes grises indiquent la position des astrocytes à t0. Barre d'échelle 100µm. **B.** Graphique représentant la vitesse moyenne de migration des astrocytes primaires (µm/min), la directionnalité moyenne de migration (%) et la persistance (%) de migration des astrocytes primaires. (Pour siαTAT1 N=3 avec 100 cellules par expérience, t test).

2.3.2 La sur-expression de TTL induit une augmentation de la vitesse de migration des astrocytes

La même expérience a été effectuée avec des astrocytes sur-exprimant la GFP seule ou TTL. On observe sur les photographies prises à 10h de migration, que les astrocytes sur-exprimant TTL migrent plus loin que les astrocytes contrôles sur-exprimant la GFP (Figure 2.5.A).

Des études préliminaires, effectuées par Melissa Glatigny dans le laboratoire ont démontré que la sur-expression de TTL dans les astrocytes primaires de rat induit une augmentation de la vitesse de migration des astrocytes sans perturber leur directionnalité et leur persistance de migration (Figure 2.5.B).

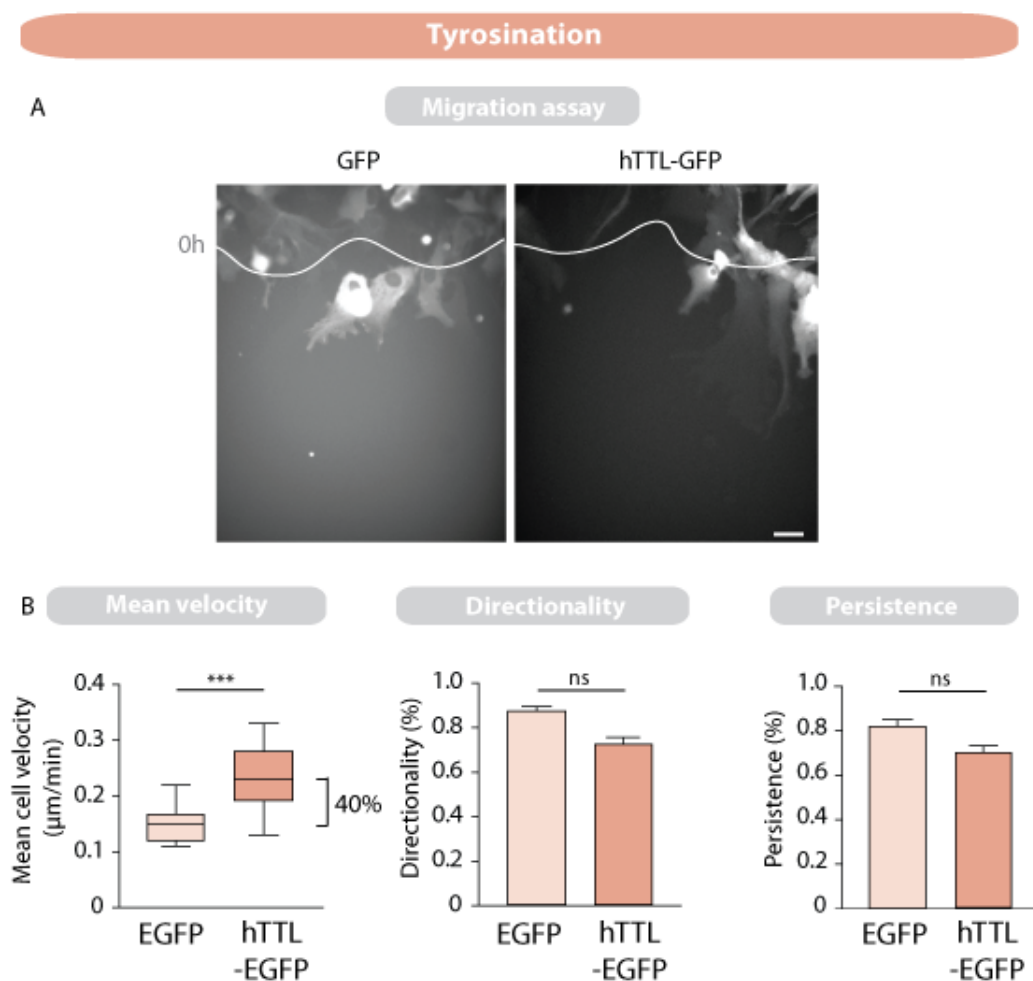


FIGURE 2.5 – Le niveau de détyrosination des microtubules régule la vitesse de migration des astrocytes

Les astrocytes primaires de rat ont été cultivés sur du plastique recouvert de poly-L-ornithine pendant 3 jours après transfection avec des plasmides codant pour la GFP ou TTL (hTTL-GFP). Un test de blessure est effectué et les astrocytes primaires de rat sont photographiés à intervalle régulier (15min) durant 24h. **A.** Photographie prise à 10h de migration. Les lignes blanches indiquent la position des astrocytes à t0. Barre d'échelle 100 μm . **B.** Graphiques représentant la vitesse moyenne de migration des astrocytes primaires ($\mu\text{m}/\text{min}$), la directionnalité moyenne de migration (%) et la persistance (%) de migration des astrocytes primaires (Pour TTL N=3 avec 20 cellules par expérience).

2.4 Les modifications du niveau d'acétylation des microtubules perturbent la vitesse de migration

J'ai observé que la diminution du niveau d'acétylation par utilisation grâce à un siRNA ciblant α TAT1 induit une diminution de la vitesse de migration des astrocytes (Partie 2.3.1).

Afin d'identifier si l'effet vient de l'absence de la protéine ou bien de la désacétylation des microtubules est j'ai effectué un test de blessure dans une condition où les microtubules sont hyper-acétylés et analysé la migration de ces astrocytes. Pour cela, les astrocytes non transfectés sont incubés dans une drogue inhibant spécifiquement la désacétylase HDAC6, la tubacine (Figure 2.6.A). Son homologue non actif, la niltubacine est utilisée comme contrôle.

L'analyse quantitative par western blot montre une augmentation significative du niveau d'acétylation des microtubules en présence de Tubacine comparé au lysat d'astrocytes contrôles (Figure 2.7.B). L'immuno-marquage des microtubules acétylés dans les différentes conditions confirme les résultats observés par western blot (Figure 2.6.C). En effet, en présence de Tubacine, la totalité du réseau de microtubules est acétylée (Figure 2.6.C).

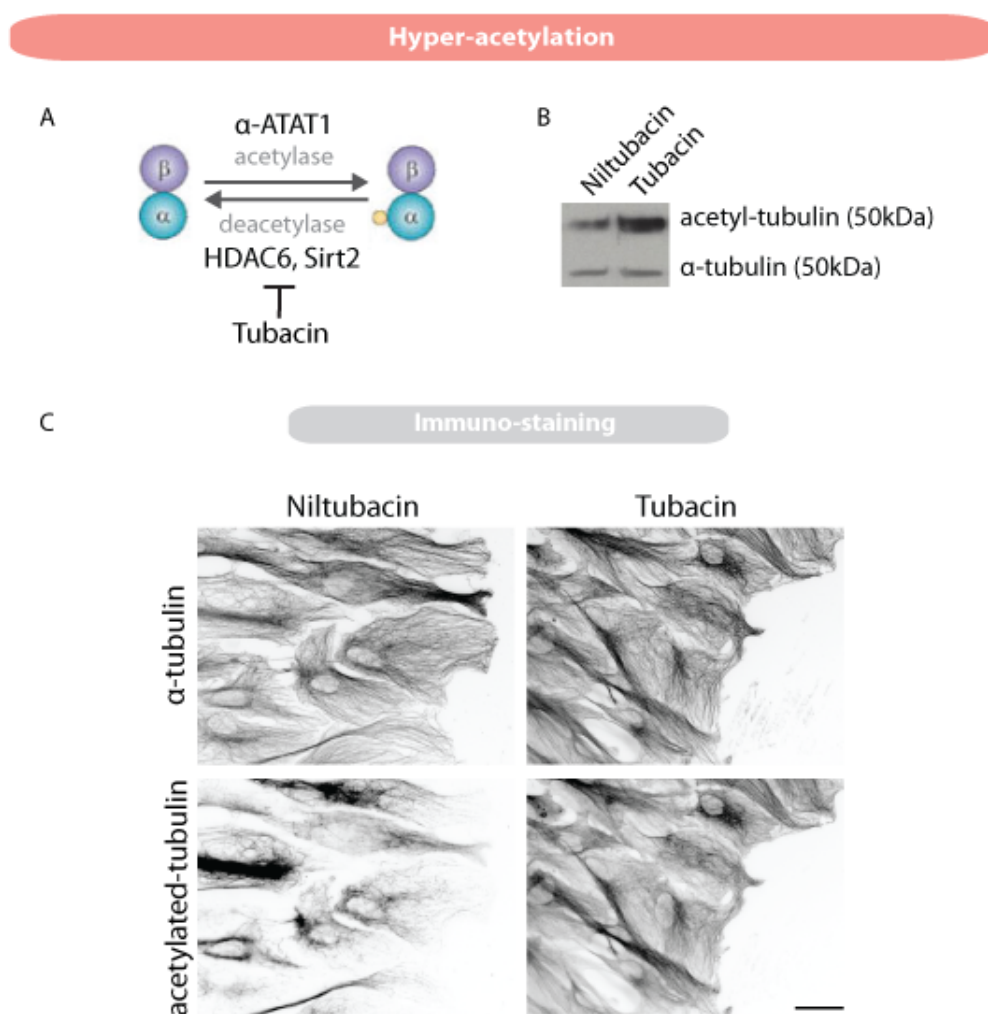


FIGURE 2.6 – L'inhibition d'HDAC6 hyper-acétyle la totalité du réseau de microtubules

A. Schéma montrant les enzymes responsables de l'acétylation/désacétylation. D'après (?). Afin d'augmenter le niveau d'acétylation des microtubules, les astrocytes primaires de rat non transfectés ont été incubés avec de la Niltubacine, utilisée comme contrôle ou de la Tubacine, inhibiteur spécifique d'HDAC6. **B.** Analyse quantitative par western blot du niveau d'acétylation après incubation avec les drogues indiquées. l'-tubuline est utilisée comme contrôle de charge. **C.** Immuno-marquage des microtubules et de l'acétylation des microtubules après 8h de migration en contraste inversé. Barre d'échelle 10 μ m.

J'ai ensuite effectué un test de blessure, identique à celui observé en Figure 2.4 et visualisé en direct la migration des astrocytes en présence de tubacine. Les astrocytes sont photographiés à intervalles réguliers (Figure 2.7.A). On observe à 16h que les astrocytes incubés avec la Tubacine, dont les microtubules sont hyper-acétylés, ont migré

moins loin que les astrocytes contrôles, incubés avec la Niltubacine. L'analyse de la migration des astrocytes en présence de Niltubacine ou Tubacine m'a permis d'observer une diminution de la vitesse moyenne de migration des astrocytes incubés avec la Tubacine (Figure 2.7.B) sans affecter leur directionnalité et leur persistance de migration (Figure 2.8.B). En présence de Tubacine, la vitesse moyenne des astrocytes est de $0.12\mu\text{m}/\text{min}$ comparé aux astrocytes contrôles dont la vitesse moyenne est de $0.18\text{-}0.2\mu\text{m}/\text{min}$ (Figure 2.7.B).

Ces résultats confirment que c'est bien le niveau d'acétylation qui régule la vitesse de migration des astrocytes.

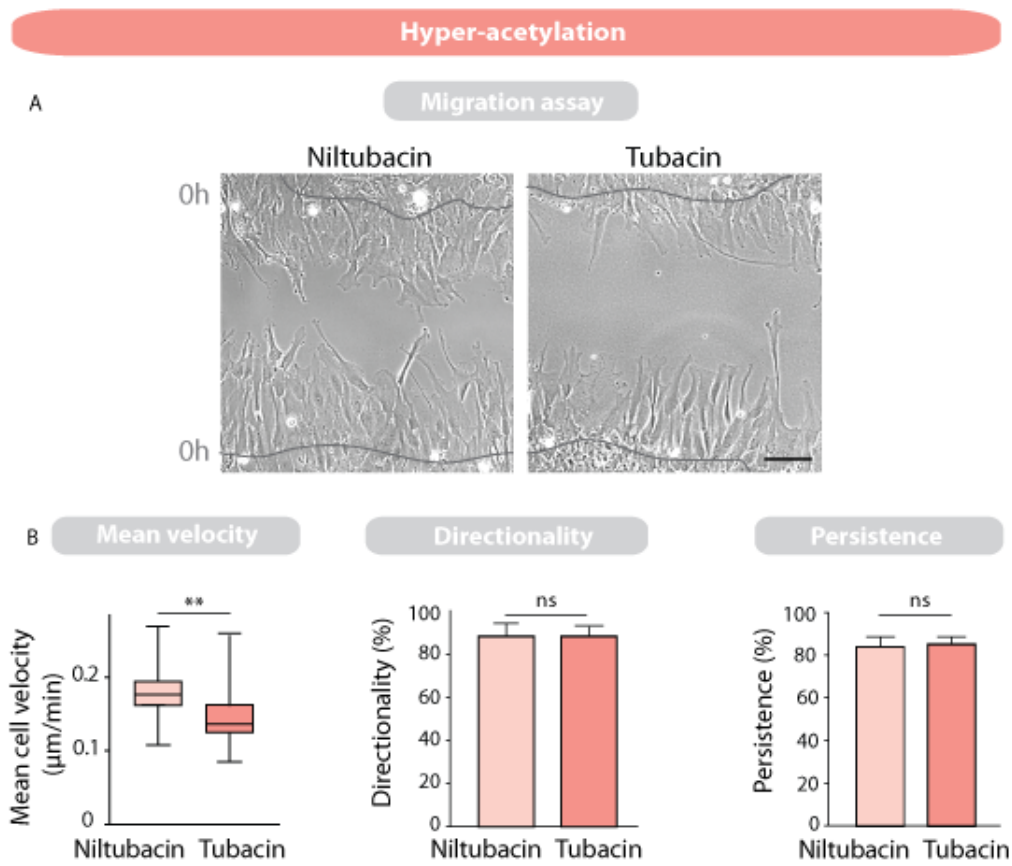


FIGURE 2.7 – Linhibition d'HDAC6 affecte la vitesse de migration des astrocytes

A. Les astrocytes sont photographiés à intervalle régulier (15min) durant 24h. Photographie prise à 16h de migration. Les lignes grises indiquent la position des astrocytes à t_0 . Barre d'échelle $100\mu\text{m}$. **B.** Graphiques représentant la vitesse moyenne de migration des astrocytes ($\mu\text{m}/\text{min}$), la directionnalité moyenne de migration (%) et la persistance (%) de migration des astrocytes primaires (N=3 avec 100 cellules par expérience / t test).

En résumé,

- La perturbation des niveaux d'acétylation et de détyrosination des microtubules affecte la vitesse de migration des astrocytes mais dans des effets opposés. La diminution du niveau d'acétylation par déplétion spécifique de l'acétyl-transférase α TAT1 induit une diminution de la vitesse de migration des astrocytes. En revanche, la diminution du niveau de détyrosination par sur-expression de l'enzyme TTL induit une augmentation de la vitesse.
- L'absence de perturbation de la directionnalité et de la persistance de migration des astrocytes dans les deux cas suggère qu'il n'y a pas de défaut de polarité dans ces deux conditions. L'acétylation et la détyrosination des microtubules ne semblent pas être impliquées dans la régulation de la polarité cellulaire.

3

L'acétyltransferase α TAT1 (ou l'acétylation) régule la dynamique des plaques d'adhérence

3.1 Localisation d' α TAT1 et des microtubules acétylés

3.1.1 Les microtubules à proximité des plaques d'adhérence sont acétylés

Durant la migration cellulaire, les microtubules s'associent de manière répétée avec les sites d'adhésion à la matrice extra-cellulaire (Rinnerthaler et al., 1988; Kaverina et al., 1999, 1998) ou viennent à proximité, afin de contribuer au contrôle de leur dynamique (Etienne-Manneville, 2013b). Le réseau de microtubules est dynamique et alterne entre des phases de polymérisation et dépolymérisation, permettant un remodelage constant du réseau et son exploration de l'espace intracellulaire (Kirschner and Mitchison, 1986). Le ciblage des plaques d'adhérence par les microtubules (Kaverina et al., 1998) et leur polymérisation en direction des sites d'adhésion au niveau de la surface ventrale des cellules a été ensuite confirmé par TIRF (Krylyshkina et al., 2003). Cependant ces expériences ont été effectuées dans des fibroblastes de poisson rouge qui possèdent un réseau de microtubules peu dense et éparse. Il est difficile d'établir si les microtubules se polymérisent en direction des plaques d'adhérence dans les cellules de mammifères comme les astrocytes qui possèdent un réseau dense de microtubules.

J'ai observé que dans les astrocytes, les microtubules viennent à proximité des plaques d'adhérence durant la migration (Figures

3.1.A et B). Les images (Figure 3.1.B) sont des agrandissements de la photographie prise Figure 3.1.A. L'astrocyte sur-exprime la paxilline, composant des plaques d'adhérence, et est incubé avec de la SirTubuline, qui permet de marquer les microtubules. J'ai aussi observé que les microtubules dans les astrocytes peuvent venir à proximité des plaques d'adhérence durant la migration (indiqué par la fleche Figure 3.1.B). Dans les astrocytes fixés après 8h de migration les microtubules situés à proximité des plaques d'adhérence sont majoritairement acétylés comme on peut le voir sur les zoom (Figure 3.1.C) et le graphique indiquant la proportion de microtubules à proximité des sites d'adhésion qui sont acétylés (Figure 3.1.D).

Ces observations confirment la présence, déjà caractérisée auparavant, des microtubules à proximité des plaques d'adhérence durant la migration et suggère une contribution possible de l'acétylation des microtubules dans la régulation de leur dynamique.

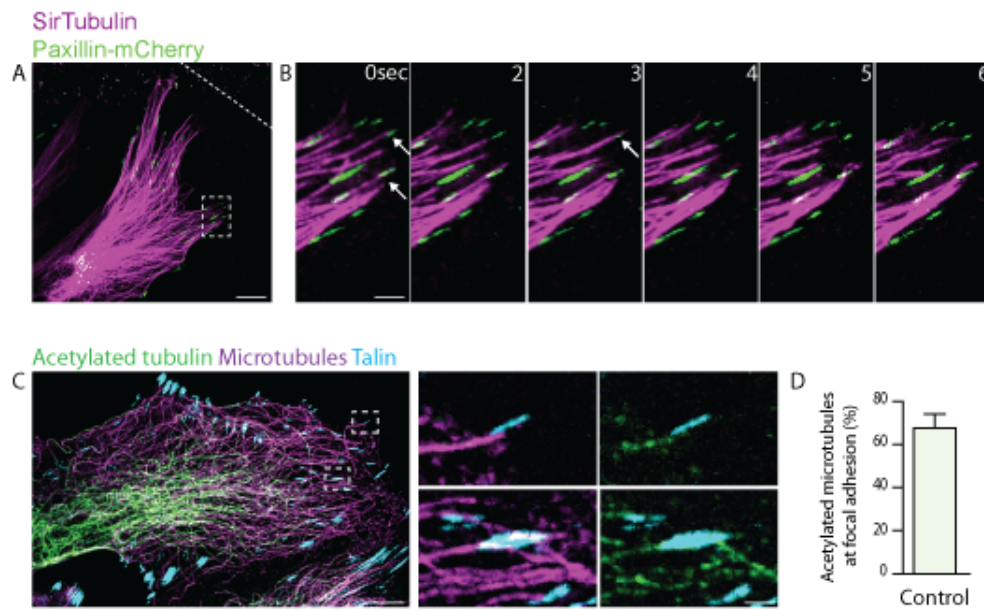


FIGURE 3.1 – Les microtubules situés à proximité des plaques d'adhérence sont acétylés

A. Photographie prise à t_0 d'un astrocyte en migration, transfecté avec le plasmide codant pour la paxilline-mCherry (en vert) 3 jours avant l'expérience. Le jour de l'expérience, les astrocytes sont incubés avec de la SirTubuline, composant marquant les microtubules (en magenta). Barre d'échelle $10\mu\text{m}$. **B.** Zooms de l'image en A. Photographies prises à intervalle régulier (1 seconde). Les flèches indiquent les microtubules situés à proximité des plaques d'adhérence. Barre d'échelle $1\mu\text{m}$. **C.** À gauche, immunomarquage des microtubules (en magenta), l'acétylation (en vert) et la taline (en cyan). À droite, les zooms indiquent la présence de microtubules acétylés au niveau des plaques d'adhérence. Barre d'échelle $10\mu\text{m}$

3.1.2 α TAT1 est localisé au niveau des plaques d'adhérence

Les astrocytes sur-expriment l'acétyl-transférase α TAT1 et la Paxilline sont photographiés à intervalle régulier afin d'observer la dynamique de l'enzyme durant la migration astrocytaire (Figure 3.2.A). On peut observer la présence de l'enzyme α TAT1 au niveau des microtubules (Figure 3.2.A). J'ai observé que les microtubules enrichis en α TAT1 sont associés aux plaques d'adhérence durant la migration comme indiqué par les flèches sur les zoom (Figure 3.2.B). Cette association s'effectue dès l'assemblage du site d'adhésion (Figure 3.2.B). En épifluorescence, on observe la localisation d' α TAT1 au niveau des microtubules dans les astrocytes sur-exprimant l'enzyme (Figure 3.2.C).

Cependant l'observation en microscopie de fluorescence par réflexion totale interne (TIRF), technique permettant l'observation des événements proches de la membrane plasmique, indique aussi une localisation de l'enzyme α TAT1 au niveau des plaques d'adhérence (Figure 3.2.D).

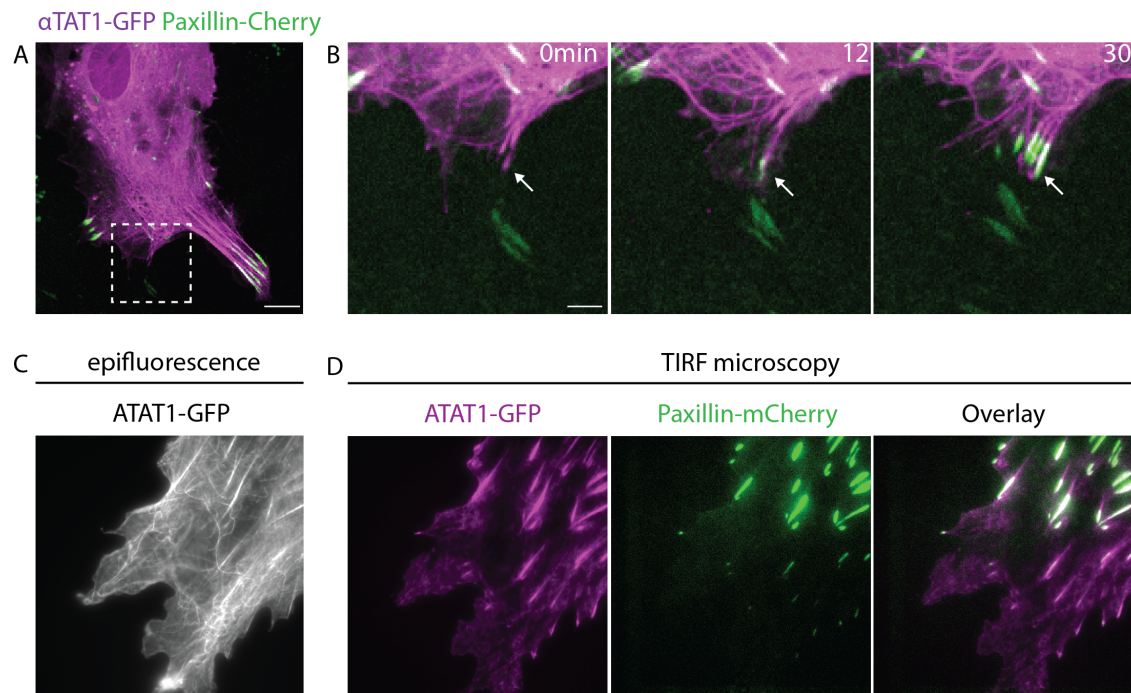


FIGURE 3.2 – L'acétyl-transférase α TAT1 est localisée au niveau des microtubules et des plaques d'adhérence

A. Photographie d'un astrocyte après 8h de migration. Les astrocytes sont transfectés avec le plasmide codant pour la paxilline-mCherry (en vert) et α TAT1 (en magenta). Barre d'échelle 5 μ m. **B.** Zooms de l'image en A. Photographies prises à intervalle régulier (minutes). Les flèches indiquent les microtubules enrichis en α TAT1 associés aux plaques d'adhérence durant la migration des astrocytes. **C.** Photographie d'un astrocyte surexprimant α TAT1-GFP après 8h de migration. **D.** L'astrocyte en C a été observé en TIRF. La paxilline est représentée en vert, α TAT1 en magenta.

3.2 La déplétion d' α TAT1 affecte la dynamique des plaques d'adhérence

3.2.1 La déplétion d' α TAT1 affecte le nombre et la distribution des plaques d'adhérence

Afin de comprendre le mécanisme de régulation de la migration des astrocytes par ces modifications, j'ai entrepris d'étudier si les processus

moléculaires essentiels à la migration des astrocytes étaient perturbés lorsque les niveaux d'acétylation et de détyrosination sont diminués. J'ai donc analysé la dynamique des sites d'adhésion de la cellule à la matrice extra-cellulaire parce qu'ils jouent un rôle crucial dans la génération de forces de traction nécessaires à la migration cellulaire et à la transduction de signaux intra et extra-cellulaires (Introduction Chapitre 1). Durant la migration, les plaques d'adhérence sont formées au front de migration et subissent un cycle de renouvellement. La plupart de ces sites d'adhésion se désassemblent à l'arrière du lamellipode. Dans le cas des astrocytes, la taille du lamellipode est limitée au front de migration, et les plaques d'adhérence sont concentrées à l'avant de la cellule à 8h de migration (Figure 3.3.A). D'autre part, les microtubules contribuent à la régulation de la dynamique des plaques d'adhérence en interagissant directement avec les sites d'adhésion ou en régulant le trafic vers et à partir des plaques d'adhérence (Introduction Chapitre 3).

La déplétion d' α TAT1 induit une augmentation du nombre de plaques d'adhérence sans affecter leur taille

Afin d'analyser la localisation des plaques d'adhérence dans les différentes conditions, les astrocytes transfectés sont cultivés sur des lamelles de verre recouvertes de poly-L-ornithine durant 4 jours afin d'obtenir une monocouche et l'efficacité désirée des siRNA utilisés. J'ai effectué un test de blessure et les astrocytes sont fixés après 8h de migration avec du paraformaldéhyde, afin d'effectuer un immunomarquage de la paxilline.

J'ai analysé le nombre moyen de plaques d'adhérence par cellule ainsi que leur aire. J'ai observé que la déplétion spécifique de l'acétyltransférase α TAT1 induit une augmentation significative du nombre de plaques d'adhérence dans les astrocytes que l'on peut observer sur l'immuno-marquage ainsi que sur le graphique (Figure 3.3.A). La déplétion de l'enzyme α TAT1 ne semble pas perturber la taille de ces plaques d'adhérence (Figure 3.3.B). En effet, sur les agrandissements, on peut voir que l'aire des sites d'adhésions reste inchangée en présence de si α TAT1 (Figure 3.3.B).

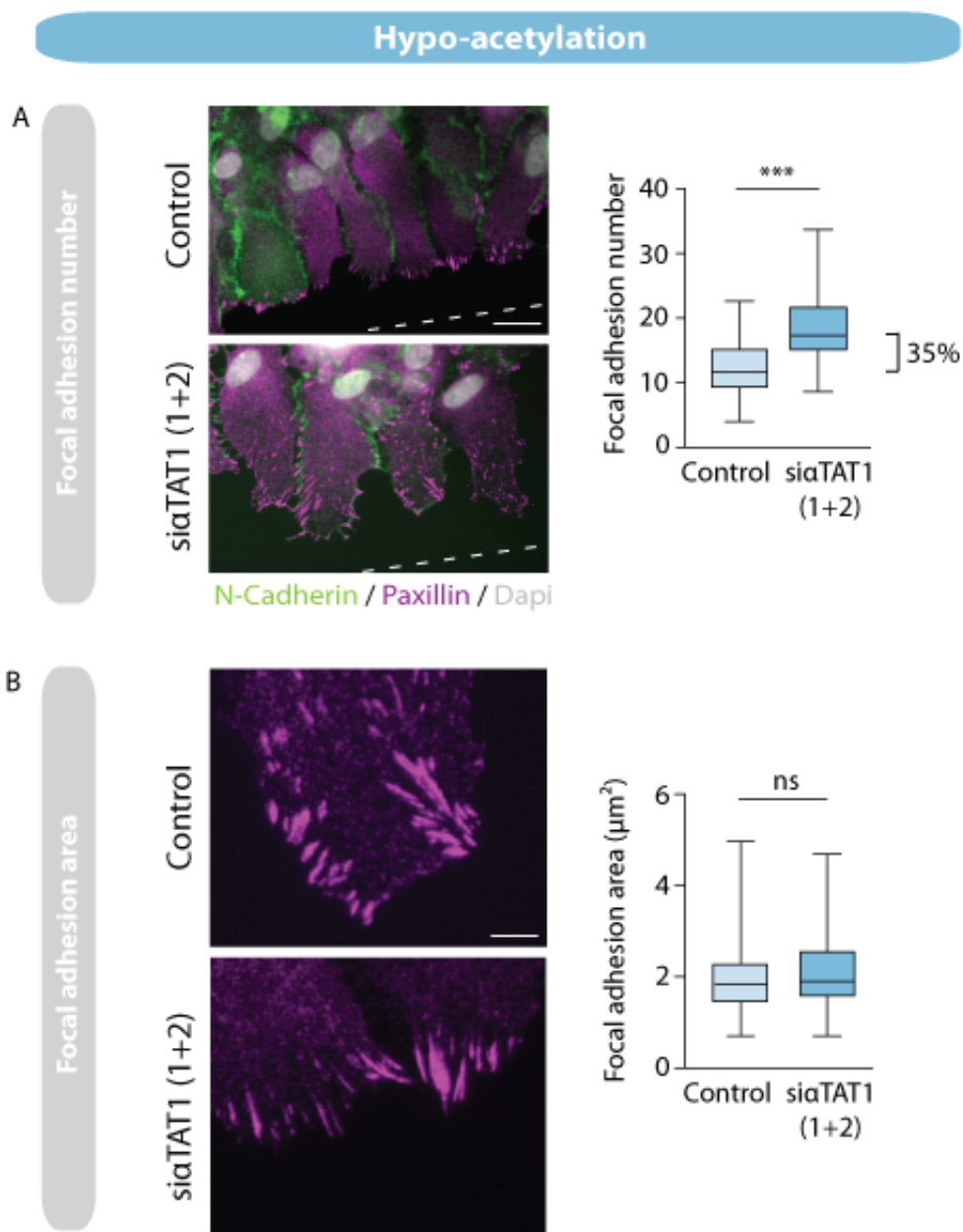


FIGURE 3.3 – La déplétion d' α TAT1 induit une augmentation du nombre de plaques d'adhérence

Les astrocytes sont fixés avec du Paraformaldéhyde 4% après 8h de migration. **A.** Immunomarquage des astrocytes après 8h de migration transfectés avec un siRNA ciblant la luciférase (Control) ou α TAT1 (si α TAT1). Les jonctions adhérentes sont indiquées en vert, les plaques d'adhérence en violet et le noyau en gris. A droite, le graphique indique le nombre moyen de plaques d'adhérence par cellule dans chacune des conditions. Barre d'échelle $10\mu\text{m}$. **B.** Agrandissement des images en A. A droite le graphique indique l'aire moyenne des plaques d'adhérence par cellule pour chaque condition. Barre d'échelle $2\mu\text{m}$ (N=3, 100 cellules par expérience, t test)

La sur-expression de la tyrosinase TTL ne semble pas affecter le nombre, la distribution et la taille des plaques d'adhérence de manière significative (Figures 3.4). Cela suggère que le niveau de détyrosination des microtubules ne contribue pas à la régulation de la migration des astrocytes via l'adhésion à la matrice durant la migration.

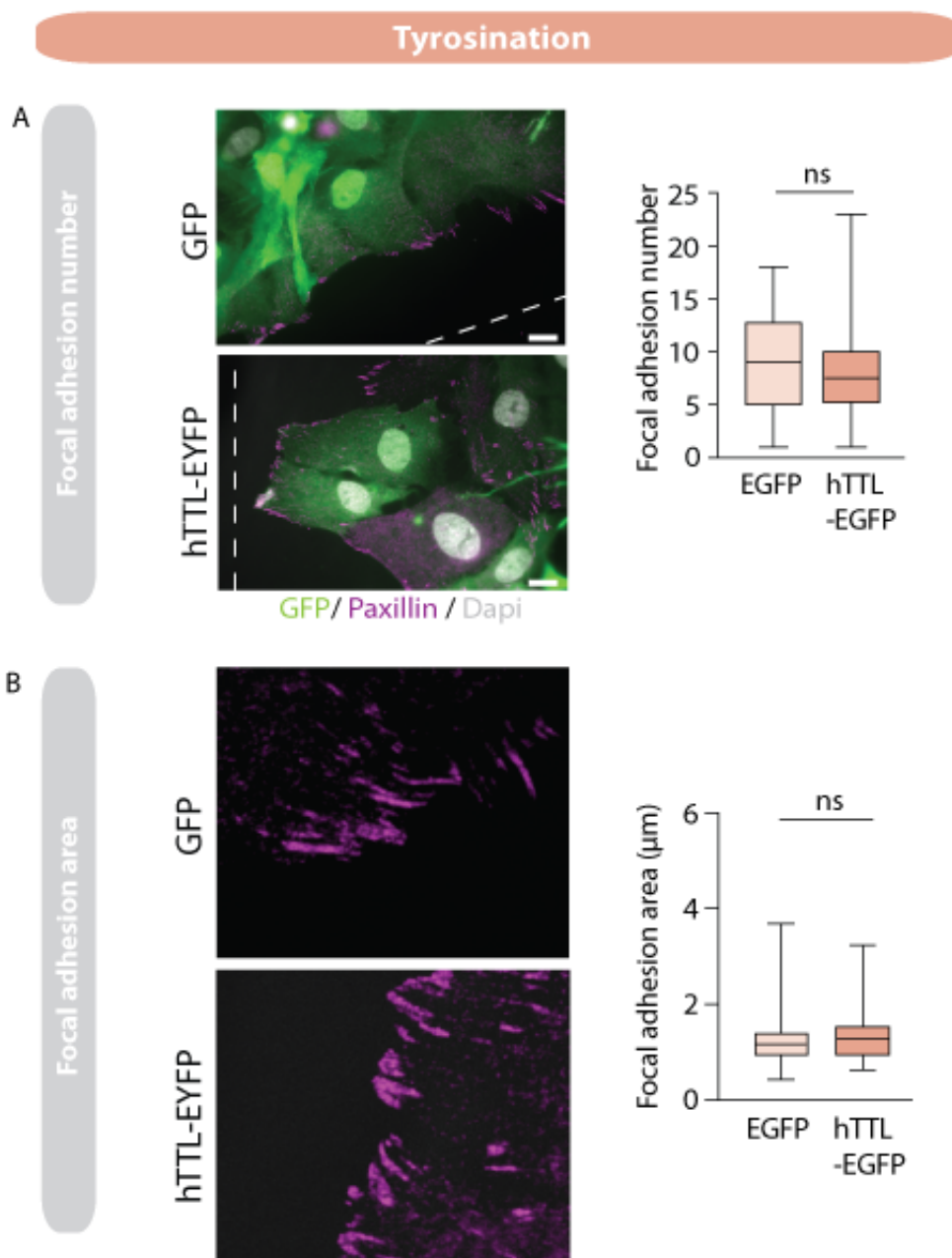


FIGURE 3.4 – La diminution du niveau de détyrosination des microtubules n’affecte ni le nombre ni la taille des plaques d’adhérence

Les astrocytes sont fixés avec du paraformaldéhyde 4% après 8h de migration. **A.** Immunomarquage d’astrocytes après 8h de migration transfectés avec le plasmide codant pour la GFP ou TTL. La GFP est indiquée en vert, les plaques d’adhérence en violet et le noyau en gris. A droite, le graphique indique le nombre moyen de plaques d’adhérence par cellule dans chacune des conditions. Barre d’échelle $10\mu\text{m}$. **B.** Agrandissements des images en A. A droite le graphique représente l’aire moyenne des plaques d’adhérence par cellule pour chaque conditions. Barre d’échelle $2\mu\text{m}$ (N=3, 100 cellules par expérience, t-test)

La déplétion d' α TAT1 perturbe la distribution des plaques d'adhérence

On observe que la distribution des plaques d'adhérence au sein de la protrusion est perturbée. En effet, dans les astrocytes transfectés avec le siRNA ciblant α TAT1, les sites d'adhésion sont dispersés au sein de la protrusion et non concentrés au front de migration de la cellule comme dans les astrocytes contrôles (Figure 3.5.B). J'ai analysé la distance entre le centre des plaques d'adhérence et le front de migration projetée sur l'axe noyau-front de migration (distance d) ainsi que la distance entre le centre du noyau et le front de migration (distance D) (Figure 3.5.A). On peut observer sur le graphique (Figure 3.5.C) que la distance d entre les plaques d'adhérence et le front de migration est plus élevée dans les astrocytes transfectés avec si α TAT1 comparé au contrôle. Cette augmentation de la distance d se produit sans perturbation de la longueur de la protrusion (distance D). L'augmentation de la distance entre les plaques d'adhérence et le front de migration indique une présence anormale des plaques d'adhérence à l'intérieur de la protrusion et suggère que la déplétion d' α TAT1 perturbe les sites d'adhésion.

On peut aussi observer que la directionnalité des plaques d'adhérence en présence de si α TAT1 semble être perturbée. En effet, les plaques d'adhérence sont généralement orientées dans la direction de migration des astrocytes. En présence de si α TAT1, les plaques d'adhérence ne sont pas orientées parallèlement à la direction de migration (Figure 3.5.B et 3.5.B).

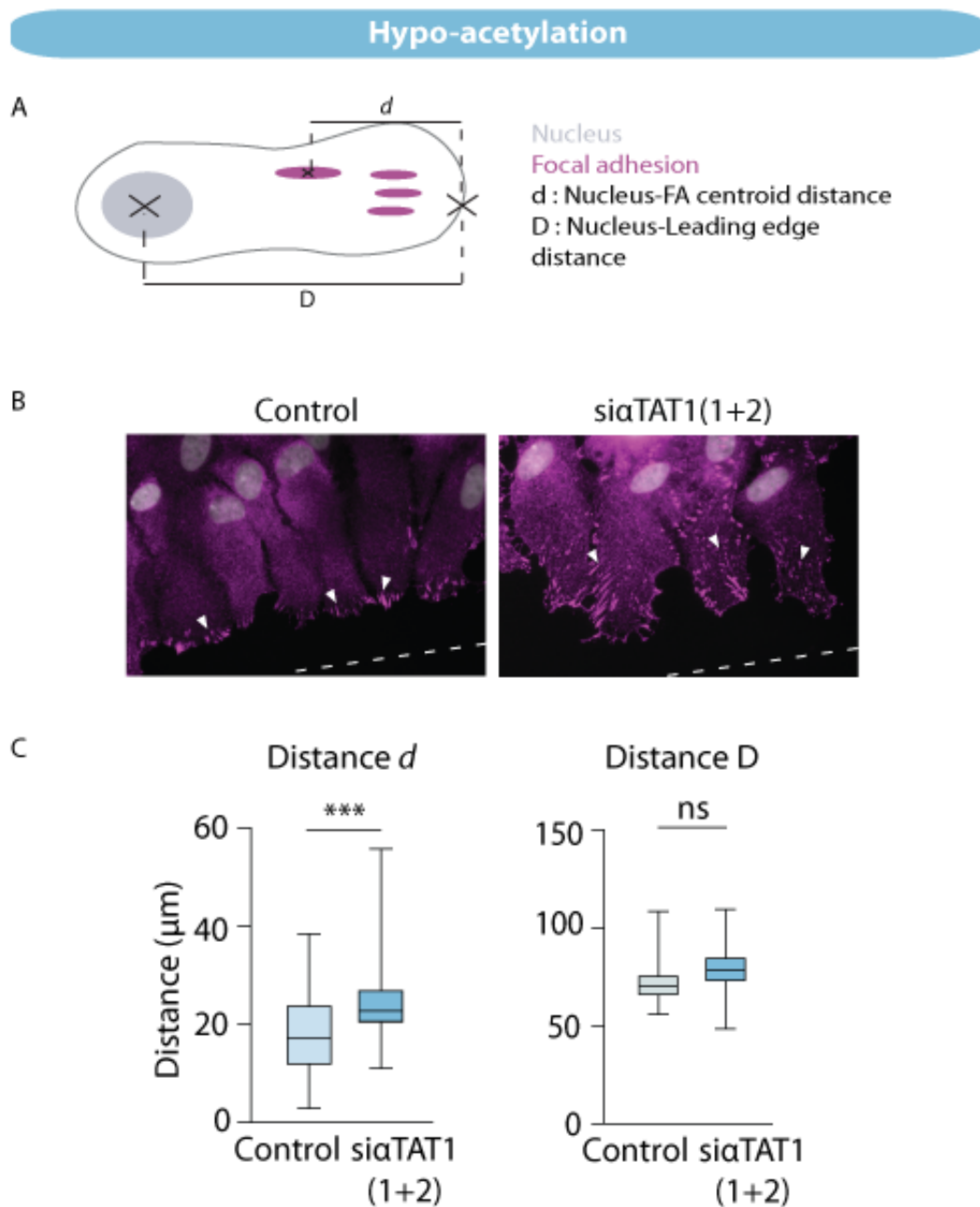


FIGURE 3.5 – La déplétion d' α TAT1 induit une perturbation de la distribution des plaques d'adhérence durant la migration des astrocytes

A. Schéma représentant les différentes distances analysées afin de quantifier la distribution des plaques d'adhérences. La distance d permet d'analyser la distance entre les plaques d'adhérence et le front de migration. La distance D représente la distance entre le centre du noyau et le front de migration **B.** Immunomarquage d'astrocytes à 8h de migration, transfectés avec un siRNA ciblant la luciférase (Ctl) ou α TAT1 ($\text{si}\alpha\text{TAT1}$). Les plaques d'adhérence sont indiquées en violet et le noyau en gris. **C.** Les graphiques indiquent les distances moyennes d et D par cellule dans chacune des conditions. (N=3, 100 cellules par expérience, t test)

J'ai effectué la même analyse dans les astrocytes sur-exprimant la GFP et TTL et je n'ai observé aucune différence de distance entre les plaques d'adhérence et le front de migration suggérant que la diminution du niveau de détyrosination n'affecte pas les sites d'adhésion à la matrice extra-cellulaire (Figure 3.6). La détyrosination des microtubules semble être impliquée dans le contrôle de la migration des astrocytes via un mécanisme de régulation différent de l'acétylation.

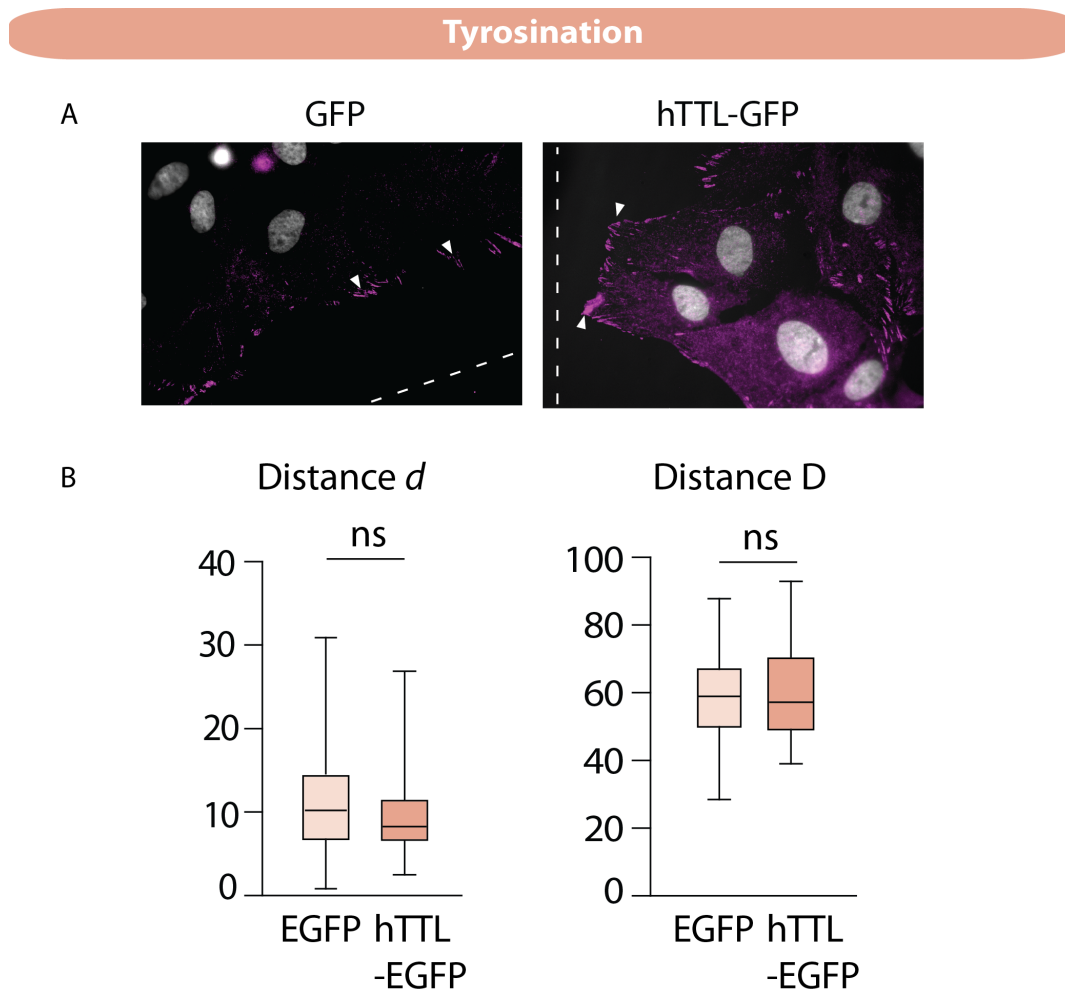


FIGURE 3.6 – La diminution du niveau de détyrosination des microtubules n'affecte pas la distribution des plaques d'adhérence durant la migration des astrocytes

A. Schéma représentant les différentes distances analysées. La distance d permet d'analyser la distance entre les plaques d'adhérence et le front de migration. La distance D représente la distance entre le centre du noyau et le front de migration. **B.** Immunofluorescence d'astrocytes à 8h de migration transfectés avec la GFP ou TTL-GFP. Les plaques d'adhérence sont indiquées en violet et le noyau en gris. **C.** Les graphiques indiquent les distances moyennes d et D par cellule dans chacune des conditions.. (N=3 100 cellules par condition, t test)

Ces résultats montrent que le niveau d'acétylation, et non le niveau de détyrosination, régule le nombre, la distribution et potentiellement l'orientation des plaques d'adhérence durant la migration astrocytaire, ce qui suggère un rôle potentiel de l'acétylation des microtubules dans le contrôle de la dynamique des plaques d'adhérence.

3.2.2 La déplétion d' α TAT1 affecte la dynamique des plaques d'adhérence

J'ai donc analysé la dynamique des plaques d'adhérence dans les astrocytes en migration. Pour cela les astrocytes sont transfectés avec un siRNA ciblant la luciférase (Control) ou ciblant α TAT1 (si α TAT1) ainsi qu'avec un plasmide codant pour la Paxilline fusionnée à un tag mCherry (Figure 3.7.A). La Paxilline est un composant des plaques d'adhérence présent durant la totalité de leur durée de vie. Par video-microscopie, et en photographiant la paxilline taguée à intervalle régulier (5 minutes), j'ai analysé la dynamique des plaques d'adhérence dans les astrocytes contrôles et déplétés en α TAT1. Dans les astrocytes contrôles, on observe que la durée de vie des plaques d'adhérence est en moyenne de 35-40min (Figure 3.7.A,B et C). Durant le cycle de vie des plaques d'adhérence, les sites d'adhésion s'assemblent. Cette étape est caractérisée par une augmentation de leur taille (Figure 3.7.A). Puis les sites d'adhésion se désassemblent, leur taille diminue (Figure 3.7.A). Dans les astrocytes contrôles, les phases d'assemblage et de désassemblage sont rapides (Figure 3.7.B). La durée de vie moyenne des plaques d'adhérence dans les astrocytes contrôles est d'environ 40 minutes, tandis que dans les astrocytes transfectés avec si α TAT1 la durée de vie des plaques d'adhérence est doublée (Figure 3.7.C) La déplétion d' α TAT1 induit une augmentation significative du temps de renouvellement des plaques d'adhérence (Figures 3.7.A,B et C). Ces résultats suggèrent que l'acétylation des microtubules régule la dynamique des plaques d'adhérence. La persistance des plaques d'adhérence au cours du temps dans les cellules déplétées d' α TAT1 suggère que l'acétylation des microtubules régule le désassemblage des sites d'adhésion.

L'analyse de chacune des étapes du cycle de vie des plaques d'adhérence dans chacune des conditions indique que la déplétion d' α TAT1

perturbe le cycle de renouvellement des plaques d'adhérence dans son ensemble (Figure 3.7.E). En effet, le temps d'assemblage des plaques d'adhérence est plus long dans les cellules transfectées avec le siRNA ciblant α TAT1 (Figure 3.7.E). Les plaques d'adhérence des astrocytes transfectés avec si α TAT1 mettent plus de temps à s'assembler que dans les conditions contrôles (Figure 3.7.A,B et E). Le temps d'assemblage est quasiment doublé. Le temps de désassemblage est lui aussi augmenté dans les astrocytes transfectés avec si α TAT1 (Figure 3.7.A,B et E). On observe aussi la présence d'une phase de stabilité (plateau) durant laquelle les plaques d'adhérence conservent une aire constante dans le temps avant de se désassembler (Figure 3.7.A,B et E). Les plaques d'adhérence, une fois assemblées, conservent une aire constante durant une certaine période avant d'initier leur désassemblage (Figure 3.7.A). Cette phase de plateau, initialement non présente dans les conditions contrôles, dure en moyenne 20 minutes (Figure 3.7.E). Ces résultats suggèrent que l'acétylation des microtubules régule la dynamique des plaques d'adhérence dans son ensemble.

J'ai aussi analysé la distance moyenne (d), depuis le front de migration, à laquelle les plaques d'adhérence se désassemblent. Celle-ci est plus grande dans les astrocytes transfectés avec si α TAT1 que dans les astrocytes contrôles (Figure 3.7.D), ce qui confirme les analyses de distribution effectuées sur astrocytes fixés (Figure 2.5). En effet, dans les conditions contrôles, les plaques d'adhérence se désassemblent majoritairement dans les $10\mu\text{m}$ situés au front de migration, distance qui correspond à la taille du lamellipode. Dans les astrocytes transfectés avec si α TAT1, les plaques d'adhérence se désassemblent plus loin du front de migration (Figure 3.7.D). L'analyse de la distance moyenne depuis le front de migration montre qu'elles s'assemblent plus loin que dans les astrocytes contrôles ce qui suggère que la déplétion d' α TAT1 perturbe aussi l'assemblage des plaques d'adhérence en plus du désassemblage (Figure 3.7.D).

Ces résultats montrent que le niveau d'acétylation des microtubules influence la dynamique des plaques d'adhérence, dans son ensemble, durant la migration des astrocytes.

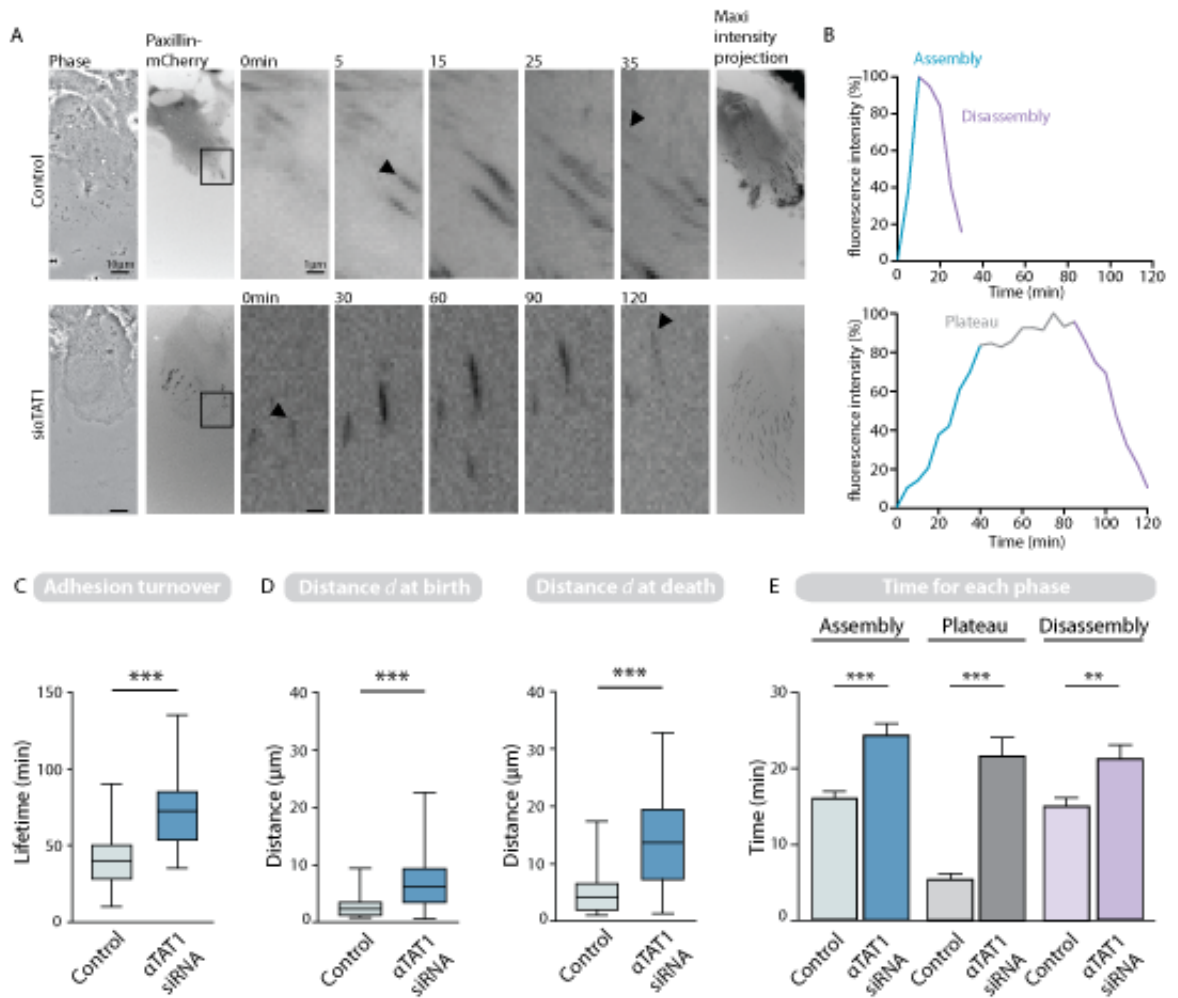


FIGURE 3.7 – La déplétion d' α TAT1 affecte la dynamique des plaques d'adhérence

A. La première photographie représente l'astrocyte à t_0 en contraste de phase. La deuxième représente l'astrocyte photographié à t_0 avec la paxilline-mCherry en contraste inversé. Au milieu, zooms des images de paxilline-mCherry prises à intervalle régulier en conditions contrôle et si α TAT1. A droite, l'image représente l'addition de toutes les photographies prises durant les 4h d'acquisition (maxi intensity projection). **B.** Exemple de dynamique de renouvellement d'une plaque d'adhérence en (A) dans les astrocytes contrôles et transfectés avec le si α TAT1. **C.** Graphique représentant le temps moyen de durée de vie des plaques d'adhérence dans chaque condition. **D.** Graphiques représentant la distance moyenne entre le centre des plaques d'adhérence et le front de migration au moment de l'assemblage (à gauche) et du désassemblage (à droite). **E.** Durée moyenne de chacune des phases d'assemblage, stabilisation et désassemblage pour chacune des conditions. (N=3, 20 plaques d'adhérence par cellule, 10 à 15 cellules par expérience, t test)

3.3 La régulation de la dynamique des plaques d'adhérence par α TAT1 semble être indépendante du niveau d'acétylation des microtubules.

3.3 La régulation de la dynamique des plaques d'adhérence par α TAT1 semble être indépendante du niveau d'acétylation des microtubules.

3.3.1 La modification du niveau d'acétylation des microtubules n'affecte pas le nombre et la distribution des plaques d'adhérence

L'hypoacétylation des microtubules par sur-expression d'HDAC6 n'affecte pas le nombre et la distribution des plaques d'adhérence

Afin de confirmer l'hypothèse que le niveau d'acétylation régule la vitesse de migration en contrôlant la dynamique des plaques d'adhérence, j'ai observé le profil des sites d'adhésions à la matrice extra-cellulaire en modulant le niveau d'acétylation des microtubules en faisant varier les niveaux d'expression des enzymes impliquées (HDAC6 et α TAT1).

Précédemment j'ai diminué le niveau d'acétylation des microtubules en utilisant des siRNAs ciblant α TAT1. Cette diminution du niveau d'expression d' α TAT1 induit une augmentation du nombre de plaques d'adhérence et une perturbation de leur distribution. J'ai confirmé que cette modification de leur localisation est due à une perturbation de leur dynamique. J'ai confirmé l'implication d' α TAT1 dans la régulation de la dynamique des plaques d'adhérence en utilisant un autre couple de siRNA ciblant α TAT1 (si α TAT1 (3+4)) (Figure 3.8). L'utilisation de différents siRNA afin de dépléter α TAT1 induit une augmentation significative du nombre de plaques d'adhérence ainsi que perturbation de leur localisation comme l'indique les immuno-marquage ainsi que les graphiques (Figure 3.8).

Afin de déterminer si la dynamique des plaques d'adhérence est régulée par le niveau d'acétylation global des microtubules ou par une des enzymes impliquées dans cette modification, j'ai induit une hypo-acétylation des microtubules en sur-exprimant HDAC6 (Figure 3.8). J'ai observé que la diminution du niveau d'acétylation par sur-expression d'HDAC6 n'a pas d'effet sur le nombre et la distribution des plaques d'adhérence comme observé sur les immuno-marquages et les graphiques (Figure 3.8). D'après les résultats obtenus précédemment, la perturbation du nombre et de la distribution des plaques d'adhé-

rence semble être corrélée à un défaut de leur dynamique (Partie 3.2). Ces résultats suggèrent donc que l'hypoacétylation des microtubules n'affecterait pas la dynamique des plaques d'adhérence.

3.3 La régulation de la dynamique des plaques d'adhérence par α TAT1 semble être indépendante du niveau d'acétylation des microtubules.

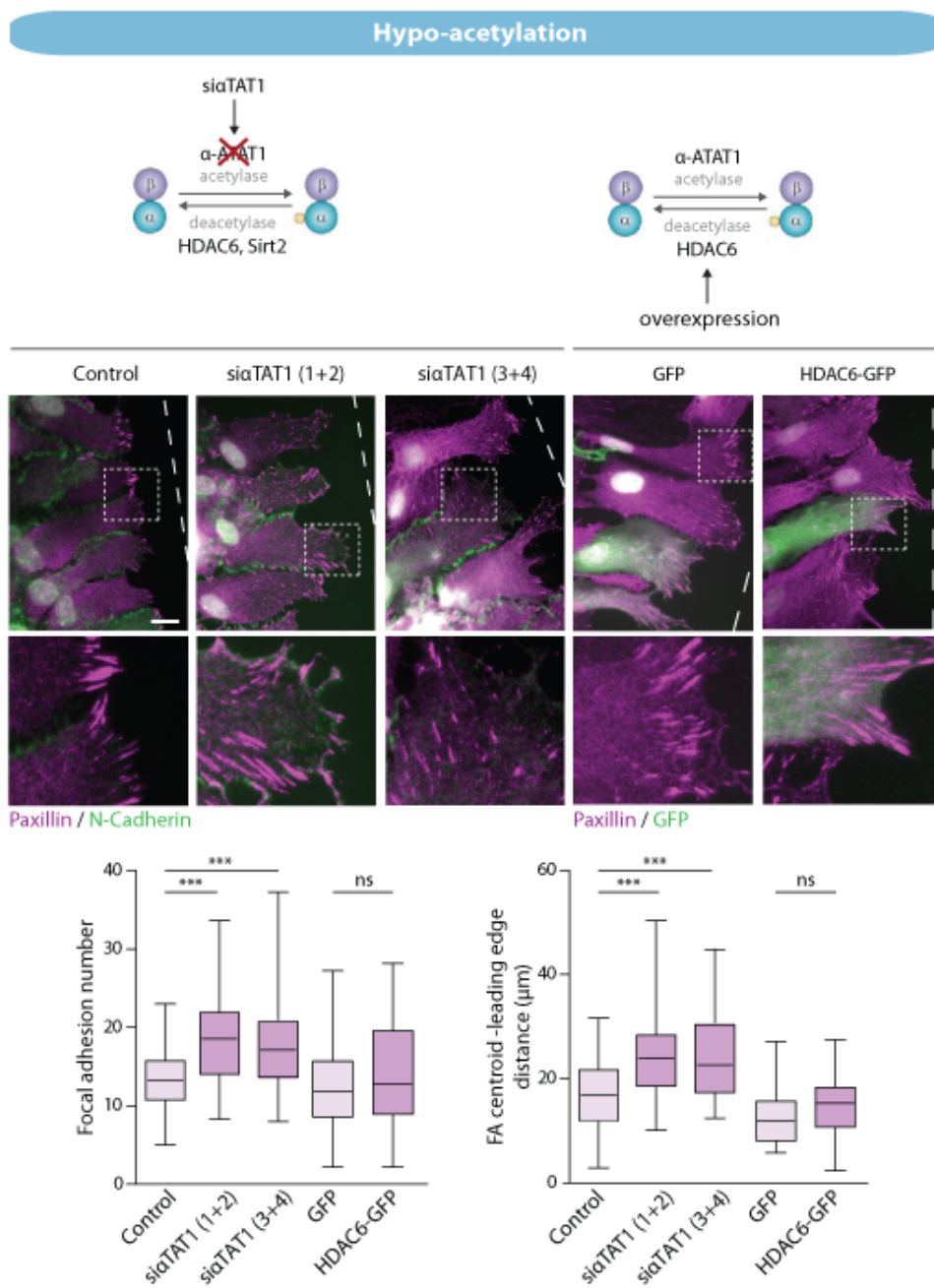


FIGURE 3.8 – L’hypo-acétylation des microtubules par sur-expression d’HDAC6 n’affecte pas la dynamique des plaques d’adhérence

L’hypo-acétylation des microtubules est induite en ciblant les différentes enzymes impliquées dans l’acétylation. Soit en ciblant α TAT1 avec un siRNA soit en sur-exprimant la désacétylase HDAC6. Les astrocytes migrent durant 8h puis sont fixés. Les immuno-marquages indiquent les plaques d’adhérence en magenta et les jonctions adhérentes en vert. Les graphiques représentent le nombre et la distribution des plaques d’adhérence dans les différentes conditions contrôles et d’hypo-acétylation des microtubules. Barre d’échelle 10μ m (N=3, 100 cellules par expérience, t test)

L'inhibition d'HDAC6 induit une augmentation du nombre de plaques d'adhérence sans perturber leur localisation

J'ai ensuite observé la dynamique de ces plaques d'adhérence après hyper-acétylation des microtubules. Pour cela j'ai surexprimé l'acétyltransférase α TAT1 ou inhibé HDAC6 par ajout de Tubacine. J'ai observé précédemment que l'inhibition d'HDAC6 par ajout de Tubacine induit une diminution de la vitesse de migration des astrocytes (Figure 3.9). On observe sur les immunomarquages que l'inhibition d'HDAC6 induit une augmentation du nombre de plaques d'adhérence, par contre elle ne perturbe pas leur distribution, comme l'indique les graphiques.

Même si elle tend à augmenter légèrement leur nombre, l'hyper-acétylation des microtubules par sur-expression de l'acétyltransférase α TAT1 n'induit pas de modification significative du nombre de plaques d'adhérence et de leur distribution.

L'hyperacétylation des microtubules par ajout de tubacine induit une augmentation du nombre de plaques d'adhérence sans affecter leur distribution bien que celle-ci induit une diminution de la vitesse de migration des astrocytes (Partie 2.4).

L'absence de perturbation de la distribution des plaques d'adhérence en faisant varier les niveaux d'acétylation suggère que la dynamique des plaques d'adhérence est régulée par α TAT1 et non par le niveau global d'acétylation des microtubules.

3.3 La régulation de la dynamique des plaques d'adhérence par α TAT1 semble être indépendante du niveau d'acétylation des microtubules.

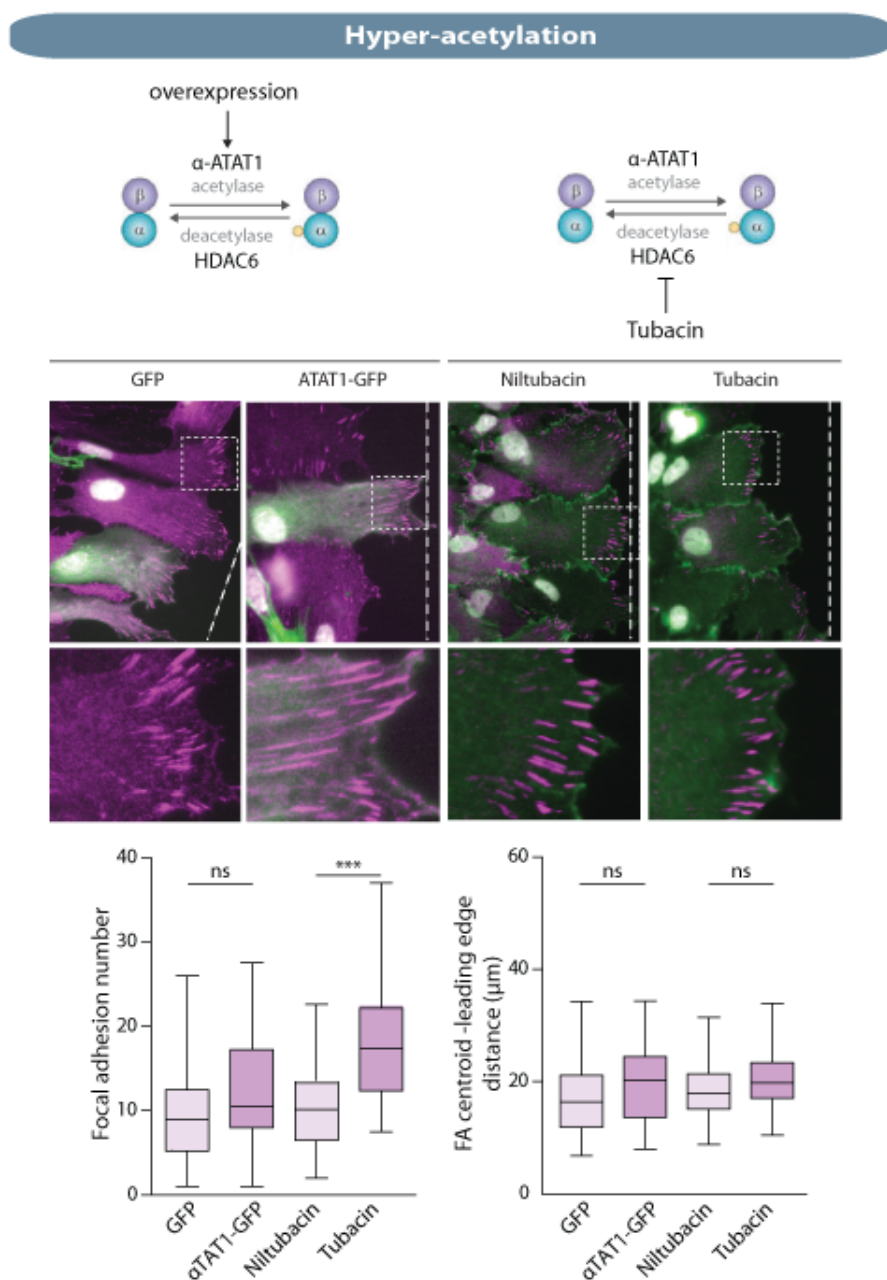


FIGURE 3.9 – L’hyper-acétylation des microtubules par inhibition d’HDAC6 affecte la dynamique des plaques d’adhérence mais pas leur distribution
 L’hyper-acétylation des microtubules est induite en ciblant les différentes enzymes impliquées dans l’acétylation. Soit en sur-exprimant α TAT1 soit en inhibant la désacétylase HDAC6 par ajout de Tubacine. Les astrocytes migrent durant 8h puis sont fixés. Les immuno-marquages indiquent les plaques d’adhérence en magenta et les jonctions adhérentes en vert. Les graphiques représentent le nombre et la distribution des plaques d’adhérence dans les différentes conditions contrôles et d’hypo-acétylation des microtubules. Barre d’échelle 10μ m (N=3, 100 cellules par expérience, t test)

Il a aussi été démontré que la localisation d' α TAT1 joue un rôle dans la dynamique des microtubules, indépendamment de son activité catalytique (Kalebic et al., 2013) et que l'enzyme est aussi localisée au niveau des puits de clathrine (Montagnac et al., 2013). J'ai sur-exprimé l'enzyme dont un résidu situé au niveau de son site catalytique est muté, induisant une perte d'activité de l'enzyme. La surexpression de l'enzyme mutée ne semble pas affecter la dynamique des plaques d'adhérence puisque ni leur nombre ni leur distribution n'est perturbé (Figure 3.10). De plus l'enzyme mutée semble avoir une légère activité catalytique. On peut observer sur l'analyse quantitative par western blot que la surexpression de l'enzyme mutée induit une augmentation du niveau d'acétylation (Figure 3.10).

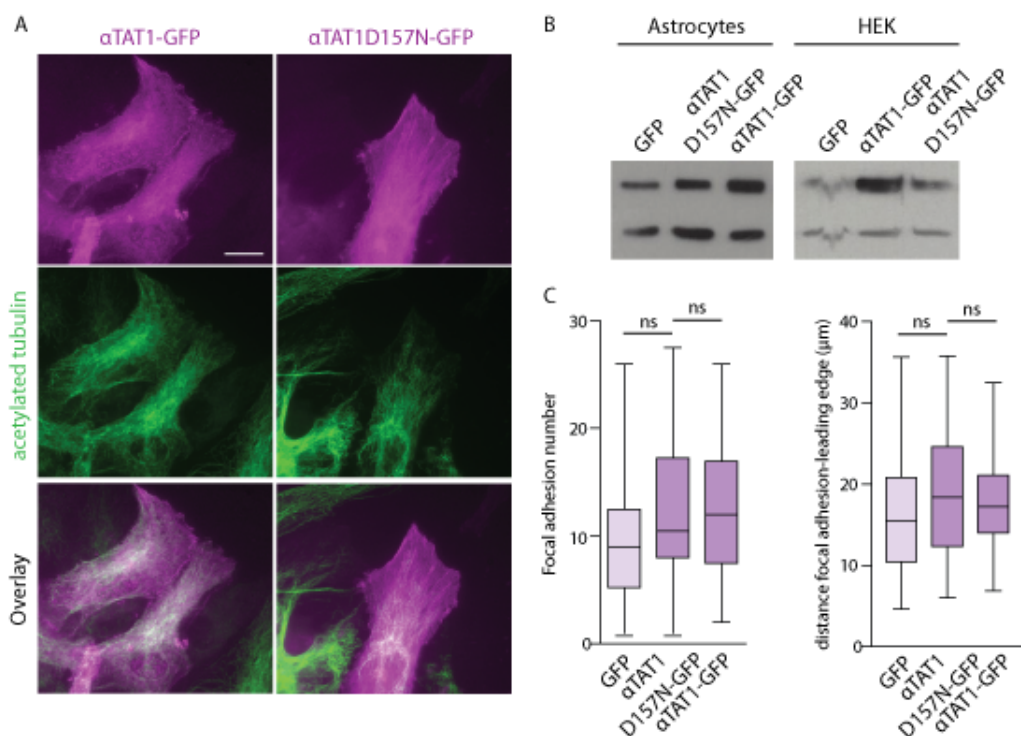


FIGURE 3.10 – La sur-expression de l'acétyltransférase mutée au niveau de son site catalytique n'affecte ni le nombre ni la distribution des plaques d'adhérence]

A. Immunofluorescence d'astrocytes primaire de rat à 8h de migration. l'acétylation est représentée en vert et les enzymes en magenta. Barre d'échelle : 10 μ m. **B.** Western blot indiquant le niveau d'acétylation dans chaque condition. **C.** Graphique indiquant le nombre et la distribution des plaques d'adhérence pour chaque condition (n=3, 100 cellules par expérience t test)

3.3 La régulation de la dynamique des plaques d'adhérence par α TAT1 semble être indépendante du niveau d'acétylation des microtubules.

3.3.2 Sauvetage phénotypique par sur-expression de l'acetyltransférase α TAT1

Afin de confirmer qu' α TAT1 régule la dynamique des plaques d'adhérence, j'ai surexprimé l'acetyltransférase α TAT1 ou inhibé HDAC6 par ajout de Tubacine dans les astrocytes transfectés avec siaTAT1 afin de rétablir dans ces astrocytes le niveau d'acétylation observé dans les conditions contrôles et d'observer si cela rétablit le phénotype d'origine.

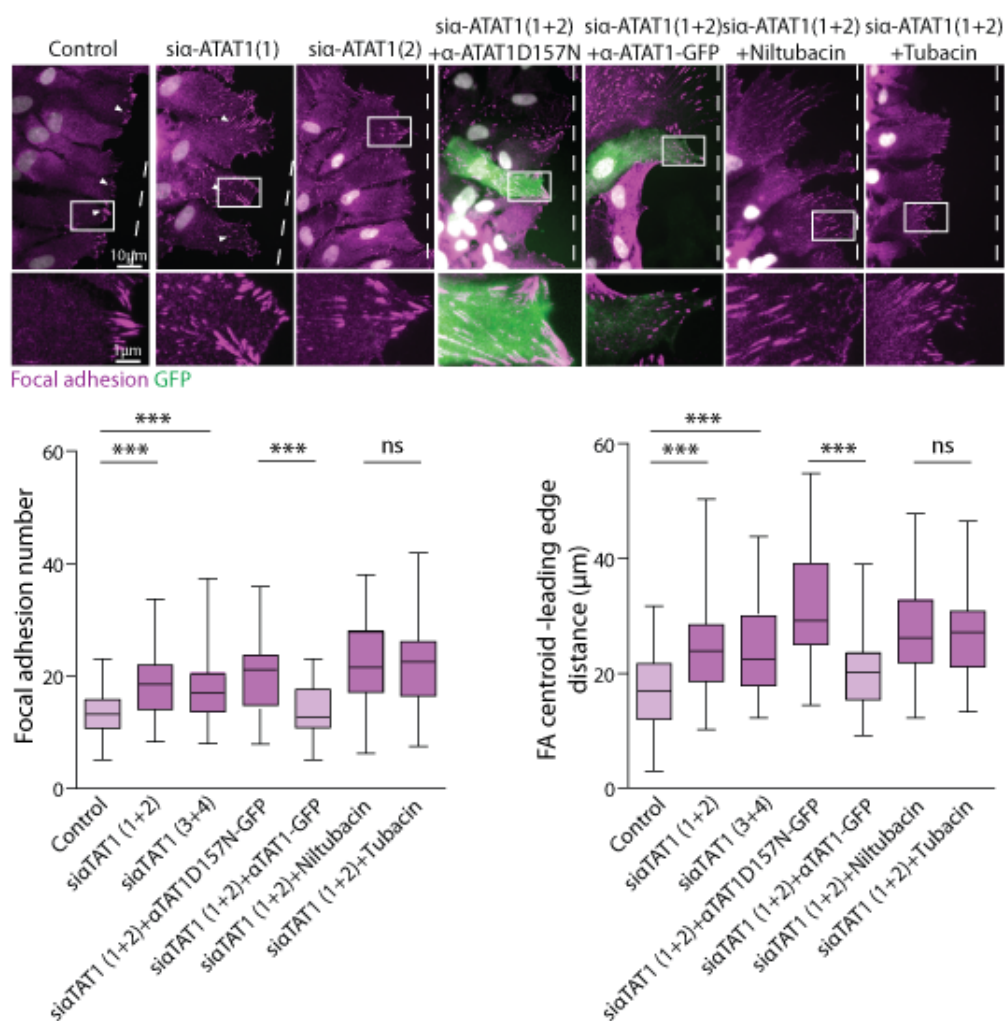


FIGURE 3.11 – Sauvetage phénotypique par surexpression d' α TAT1.

Les astrocytes sont fixés après 8h de migration. Les immunomarquages montrent les plaques d'adhérence en magenta et les jonctions adhérentes ou la GFP en vert. Les graphiques représentent le nombre et la distribution des plaques d'adhérence dans les différentes conditions contrôles et d'hypo-acétylation des microtubules. Barre d'échelle 10 μ m (N=3, 100 cellules par expérience, t test)

La surexpression de la forme inactive d' α TAT1 (α TAT1D157N-GFP), dont un des résidus situés dans le site catalytique est muté, dans les astrocytes transfectés avec si α TAT1, n'induit pas de sauvetage phénotypique. En effet, le nombre et la distribution des plaques d'adhérence reste perturbé (Figure 3.11). Cependant la sur-expression de la forme active de l'enzyme α TAT1 (α TAT1-GFP) dans les astrocytes transfectés avec si α TAT1 induit un sauvetage phénotypique. Le nombre de plaques d'adhérence et leur distribution sont alors similaires au contrôle (Figure 3.11).

J'ai effectué la même expérience mais cette fois-ci en inhibant HDAC6 par ajout de Tubacine dans les cellules transfectées avec si α TAT1. L'ajout de Niltubacine ou de Tubacine n'induit pas sauvetage phénotypique et ne rétablit pas le nombre et la distribution des plaques d'adhérence dans les cellules transfectées.

La présence d' α TAT1 au niveau des plaques d'adhérence et le sauvetage phénotypique suggèrent qu' α TAT1 contribue à la dynamique des plaques d'adhérence de par sa localisation. Ces résultats confirment l'implication d' α TAT1 dans le contrôle de la dynamique des plaques d'adhérence. Cependant ils suggèrent aussi que c'est l'enzyme α TAT1 qui contribue à la régulation de la dynamique des plaques et non le niveau global d'acétylation des microtubules ou HDAC6.

3.4 L'absence d'APC phénotypie l'absence d' α TAT1

3.4.1 APC contrôle l'acétylation des microtubules

APC est une protéine qui contribue à la stabilisation des microtubules au front de migration et il a été observé que l'absence d'APC induit une diminution du niveau d'acétylation des microtubules (Kroboth et al., 2007). J'ai donc induit une déplétion d'APC dans les astrocytes, en utilisant un siRNA, afin de déterminer si ce lien fonctionnel entre le niveau d'acétylation des microtubules et APC existe dans les astrocytes. La déplétion d'APC grâce à un siRNA induit une diminution du niveau d'expression de la protéine (Figure 3.12). J'ai analysé l'intensité de fluorescence de l'acétylation puis normalisé par celle de la tubuline afin de quantifier le niveau d'acétylation des cellules.

J'ai observé une diminution du niveau d'acétylation des microtubules dans les astrocytes transfectés avec le siAPC (Figure 3.12).

Ces résultats suggèrent qu'il existe un lien entre APC et le niveau d'acétylation des microtubules dans les astrocytes.

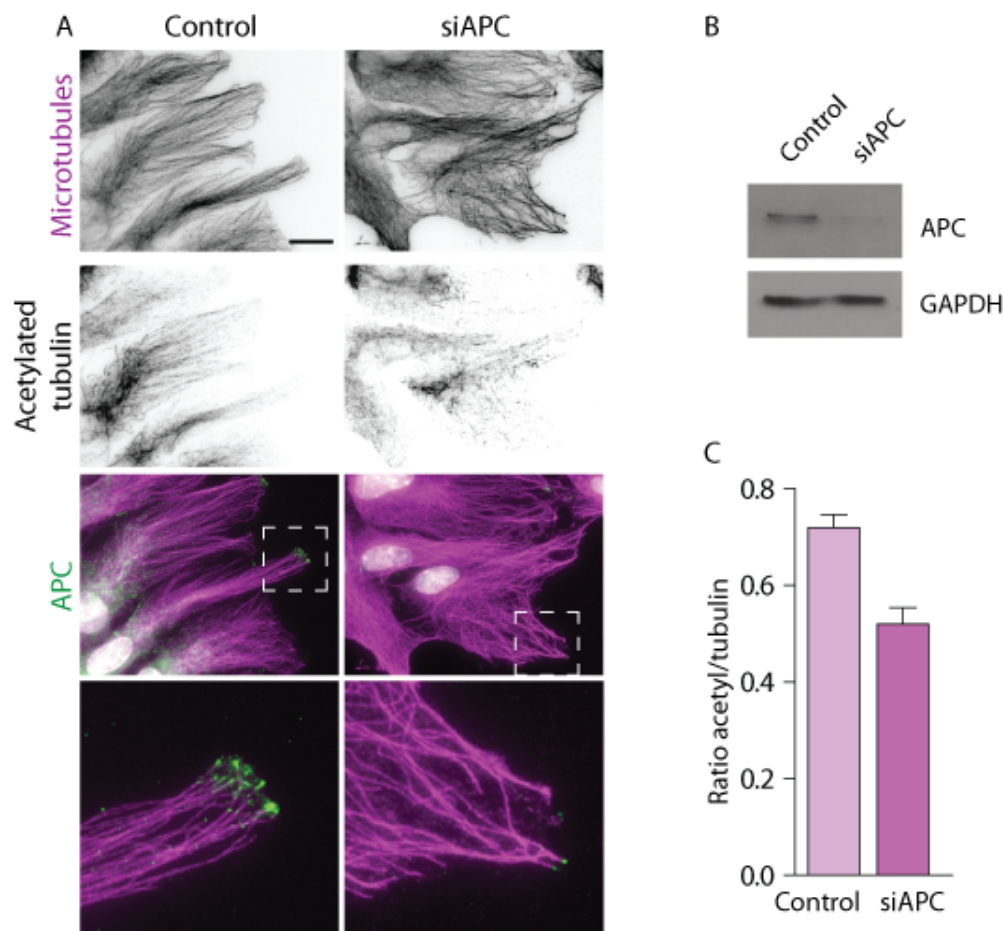


FIGURE 3.12 – Lien entre APC et l'acétylation des microtubules

A. Immunofluorescence d'astrocytes après 8h de migration. Les astrocytes sont transfectés avec un siRNA ciblant la luciférase (Control) ou APC (siAPC). Les microtubules sont marqués en magenta, APC en vert et l'acétylation en gris, contraste inversé. Barre d'échelle 10 μ m. **B.** Analyse quantitative par western blot du niveau d'expression d'APC dans des lysats d'astrocytes transfectés avec un siLuciférase (Control) ou siAPC. GAPDH est utilisé comme contrôle de charge. **C.** Graphique représentant le niveau d'acétylation par cellule normalisé par le taux de tubuline totale.(n=1 100 cellules par condition, SEM pour les 100 cellules).

3.4.2 La déplétion d'APC induit une perturbation de la dynamique des plaques d'adhérence

Afin de confirmer le lien entre APC et le niveau d'acétylation des microtubules, j'ai analysé si la diminution du niveau d'expression d'APC influence la dynamique des plaques d'adhérence de la même manière que dans les cellules dépourvues d' α TAT1. En effet l'hypoacétylation des microtubules induite par l'absence d' α TAT1 perturbe la dynamique des plaques d'adhérence et l'absence d'APC induit une hypoacétylation des microtubules. J'ai observé que l'absence d'APC induit une augmentation du nombre de plaques d'adhérence et affecte leur distribution indiquant une perturbation de leur dynamique (Figure 3.13)

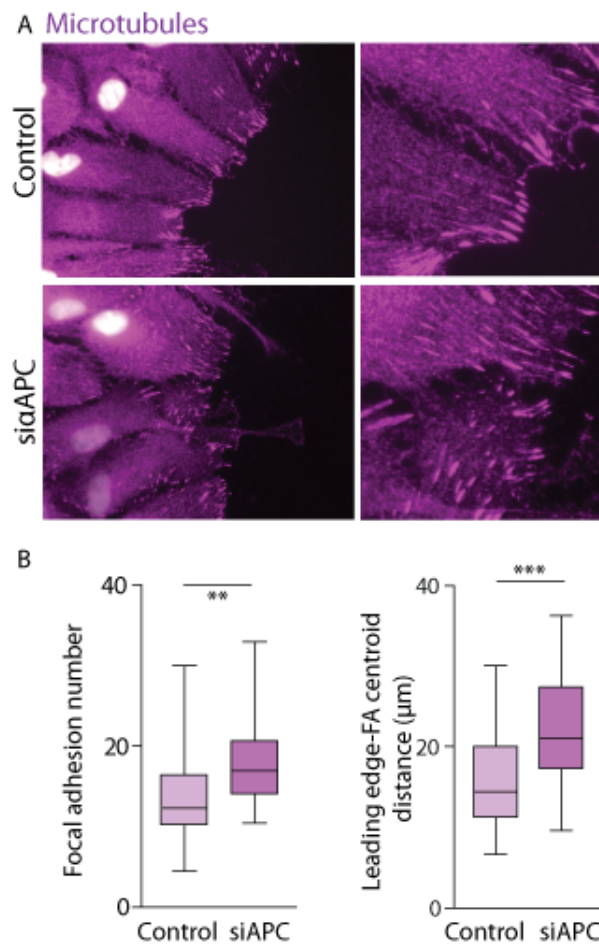


FIGURE 3.13 – La déplétion d'APC induit une perturbation de la dynamique des plaques d'adhérence

A. Immunofluorescence d'astrocytes après 8h de migration. Les astrocytes sont transfectés avec un siRNA ciblant la luciférase (Control) ou APC (siAPC). Les plaques d'adhérence sont représentées en magenta. Barre d'échelle $10\mu\text{m}$. **B.** Graphiques représentant le nombre moyen de plaques d'adhérence par cellule pour chaque condition (à gauche) et la distance moyenne entre les plaques d'adhérence et le front de migration (à droite) ($n=3$, 100 cellules par expérience, t test)

En résumé,

- La déplétion d' α TAT1 affecte la dynamique des plaques d'adhérence ce qui signifie que l'acétylation des microtubules ou la présence de la protéine contribue à la régulation de leur dynamique.
- Le sauvetage phénotypique observé après sur expression d' α TAT1, couplé à sa localisation au niveau des sites d'adhésion, suggère un rôle spécifique de l'acétyltransférase dans la régulation de cette dynamique.
- APC a un rôle possible dans la régulation du niveau d'acétylation des microtubules ou d' α TAT1.

4

l'acétylation des microtubules par α TAT1 régule le trafic membranaire à proximité des plaques d'adhérence.

4.1 α TAT1 contrôle la dynamique des plaques d'adhérence en régulant la capture des microtubule par MICAL3

4.1.1 MICAL3 et ELK sont recrutés à proximité des plaques d'adhérence durant la migration astrocytaire

La stabilisation et la capture des microtubules au front de migration, au niveau de la membrane plasmique est nécessaire à la régulation de la dynamique des plaques d'adhérence durant la migration. En effet la localisation des microtubules à proximité des sites d'adhésion permet le transport vers et à partir des plaques d'adhérence, et la régulation localisée de l'exocytose et l'endocytose de composants nécessaires à leur dynamique.

Les protéines contribuant à la capture des microtubules au niveau de la membrane plasmique à proximité des plaques d'adhérence sont diverses (Akhmanova and Steinmetz, 2008). Parmi ces protéines ELK et MICAL3 contribuent à la capture des microtubules afin de réguler l'exocytose de cargos au niveau de la membrane plasmique (Grigoriev et al., 2007). Dans les astrocytes, les protéines MICAL3 et ELK se situent à proximité des plaques d'adhérence (Figure 4.1.A et B). Les astrocytes sur-exprimant MICAL3 (MICAL3-GFP) ou ELK (ELK-GFP) ainsi que la Paxilline (Paxillin-mCherry) ont été photographiés à intervalle régulier. On observe que MICAL3 est recruté à proximité des

4.1 α TAT1 contrôle la dynamique des plaques d'adhérence en régulant la capture des microtubule par MICAL3

plaques d'adhérence dès l'assemblage des plaques d'adhérence jusqu'à leur désassemblage (Figure 4.1.A).

La localisation de ces protéines à proximité des plaques d'adhérence suggère leur contribution à la dynamique des plaques d'adhérence durant la migration.

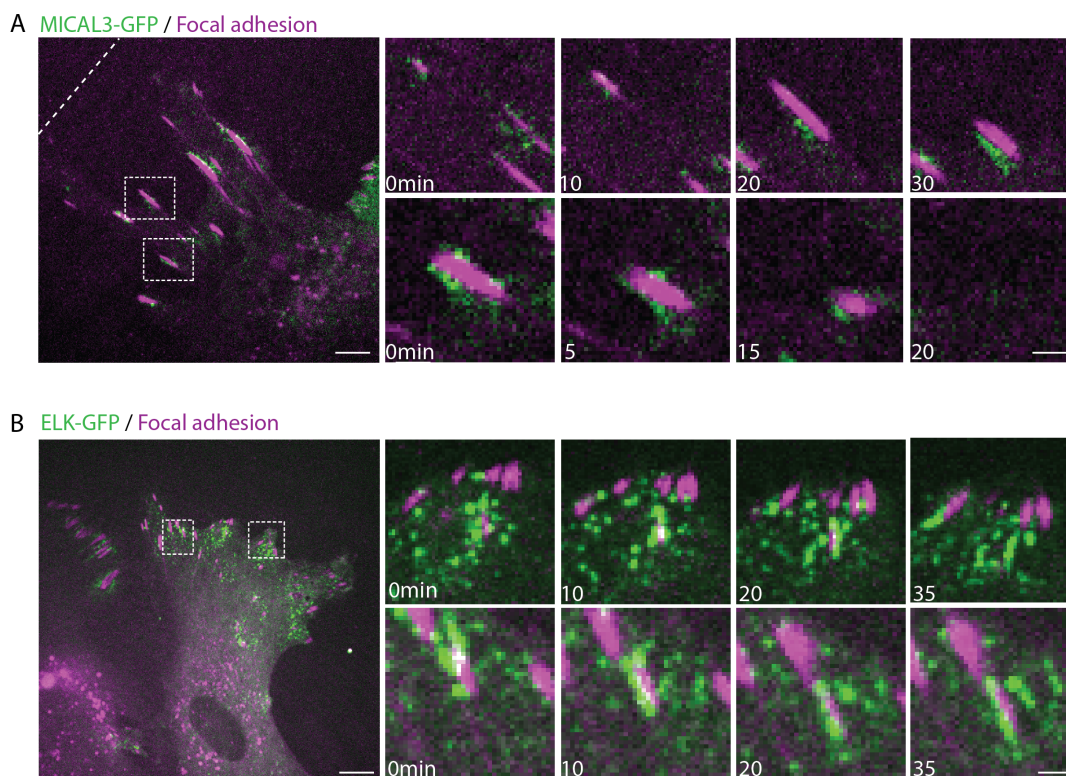


FIGURE 4.1 – MICAL3 et ELK sont recrutés à proximité des plaques d'adhérence

Les astrocytes sur-expriment les protéines MICAL3 ou ELK et la Paxilline. **A.** Photographies prises à intervalle régulier (minutes) durant la migration des astrocytes sur-exprimant MICAL3 et la Paxilline. **B.** Photographies prises durant la migration des astrocytes sur-exprimant ELK et la Paxilline. Barre d'échelle $5\mu\text{m}$ sur les images à gauche et $1\mu\text{m}$ sur les agrandissements.

4.1.2 α TAT1 régule le recrutement de MICAL3 à proximité des plaques d'adhérence

Dans les cellules transfectées avec $\text{si}\alpha\text{TAT1}$, je n'ai pas observé de défaut de localisation de ELK au niveau des plaques d'adhérence, comme l'indique l'image et le graphique représentant la proportion de plaques d'adhérence décorées par ELK par cellule (Figure 4.2.A).

Cependant j'ai observé un défaut de recrutement de MICAL3 dans les astrocytes transfectés avec $\text{si}\alpha\text{TAT1}$ (Figure 4.2.B).

Ces résultats montrent qu' α TAT1 est nécessaire au recrutement de MICAL3 à proximité des plaques d'adhérence dans les astrocytes en migration. Ils suggèrent qu' α TAT1 est impliquée dans la capture des microtubules près des sites d'adhésion afin de réguler leur dynamique.

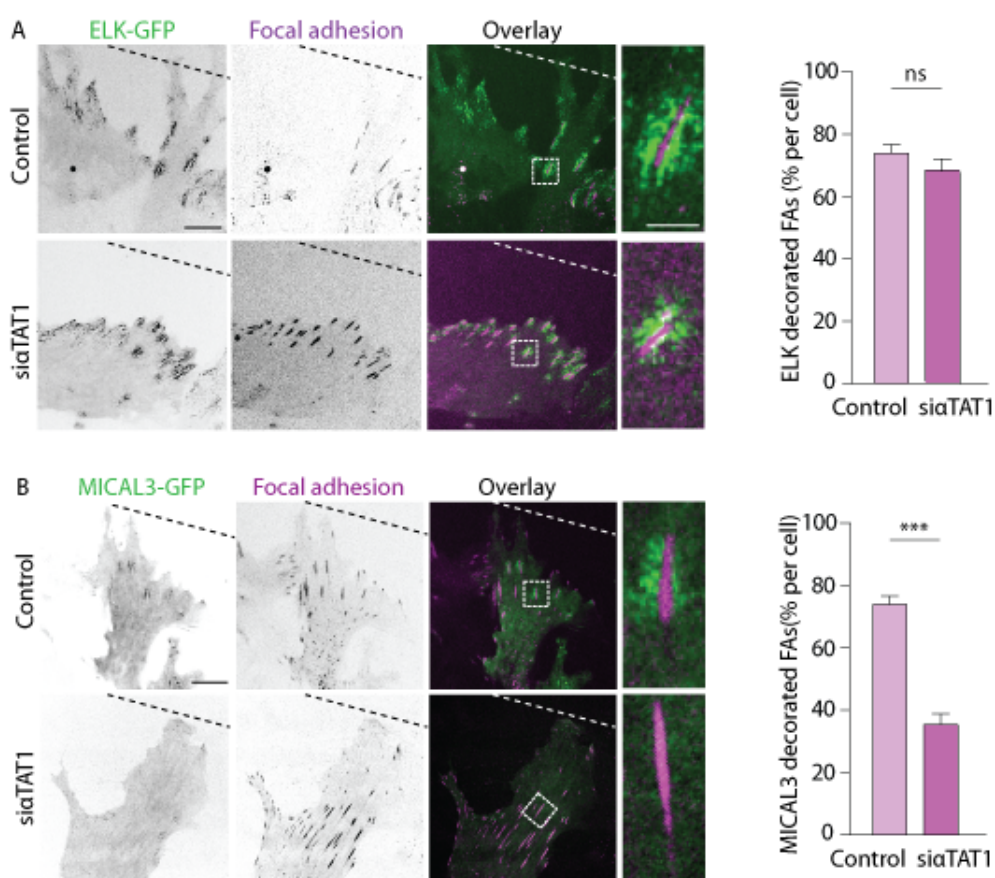


FIGURE 4.2 – α TAT1 est nécessaire au recrutement de MICAL3 mais pas de ELK

A. Les astrocytes sur-expriment les protéines ELK et Paxilline. Photographies prises à 8h de migration. Le graphique représente la proportion de plaques d'adhérence par cellule décorées par ELK. **B.** Les astrocytes sur-expriment les protéines MICAL3 et Paxilline. Photographies prises à 8h de migration. Le graphique représente la proportion de plaques d'adhérence par cellule décorées par MICAL3. Barre d'échelle $10\mu\text{m}$. ($n=3$, 50 cellules par expérience, t test)

4.2 α TAT1 contrôle le trafic vésiculaire dépendant des Rab6A au niveau des plaques d'adhérence

La stabilisation et la capture des microtubules au front de migration au niveau de la membrane plasmique sont essentielles à la régulation de la dynamique des plaques d'adhérence. Le recrutement des microtubules à proximité des sites d'adhésions permet de contrôler l'exocytose localisée de cargos. MICAL3 participe à la capture des microtubule nécessaire à l'exocytose de vésicules, notamment celles Rab6A positives (Grigoriev et al., 2007, 2011).

J'ai donc analysé si la déplétion d' α TAT1, qui induit un défaut de recrutement de MICAL3, affecte l'exocytose des cargos Rab6A positifs. Pour cela j'ai analysé le trafic de ces vésicules dans les astrocytes en migration à proximité des plaques d'adhérence. Les astrocytes qui surexpriment Rab6A et la Paxilline sont photographiés à intervalle régulier (5 secondes) durant 10 minutes (Figure 4.3.A et B). Afin d'analyser la localisation spatio-temporelle des vésicules Rab6A positives à proximité des plaques d'adhérence, j'ai effectué des kymographes (Figure 4.4.A, B et C). Les kymographes sont des représentations graphiques de la localisation des vésicules (en vert) au cours du temps à proximité des plaques d'adhérence (en magenta) le long d'une ligne épaisse. Les kymographes sont tracés dans le sens indiqué par la flèche (Figure 4.3.A et B) et avec une épaisseur représenté par le carré (Figure 4.3.A et B). Dans les astrocytes en migration, les vésicules Rab6A positives sont transportées depuis l'appareil de Golgi vers les plaques d'adhérence puis sont exocytées au niveau de la membrane plasmique. Dans les conditions contrôles, on observe la présence de vésicules Rab6A à proximité des plaques d'adhérence (Figure 4.3.A). On peut observer différents phénotypes concernant les vésicules Rab6A positives (Figure 4.3.C) :

- fusion : les vésicules sont transportées à proximité des plaques d'adhérence puis disparaissent, probablement exocytées (indiqué par les flèches blanches),
- formation : les vésicules Rab6A positives peuvent apparaître à proximité des plaques d'adhérence,
- passage : les vésicules Rab6A positives "passent" à proximité des plaques d'adhérence,

- persistance : les vésicules Rab6A positives sont transportée à proximité des plaques d'adhérence et persistent pendant une longue période avant de disparaître,

Dans les astrocytes transfectés avec si α TAT1, on observe sur le kym Cependant mais celles ci persistent à proximité des sites d'adhésions durant un temps plus long que dans les astrocytes contrôles avant de disparaître (Figure 4.3.B). J'ai aussi analysé la proportion de vésicules exocytées à proximité des plaques d'adhérence dans les deux conditions et j'ai observé qu'il y a moins d'évènements de fusion des vésicules Rab6A positives à proximité des plaques d'adhérence dans les astrocytes transfectés avec si α TAT1 que dans les astrocytes contrôles (Figure 4.3.C).

La déplétion d' α TAT1 induit une diminution du nombre de vésicules Rab6A-positives exocytées. Les vésicules Rab6A positives persistent aussi plus longtemps à proximité des plaques d'adhérence dans cette condition. Nous en déduisons que la déplétion d' α TAT1 perturbe l'exocytose des vésicules Rab6A positives à proximité des plaques d'adhérence.

4.2 α TAT1 contrôle le trafic vésiculaire dépendant des Rab6A au niveau des plaques d'adhérence

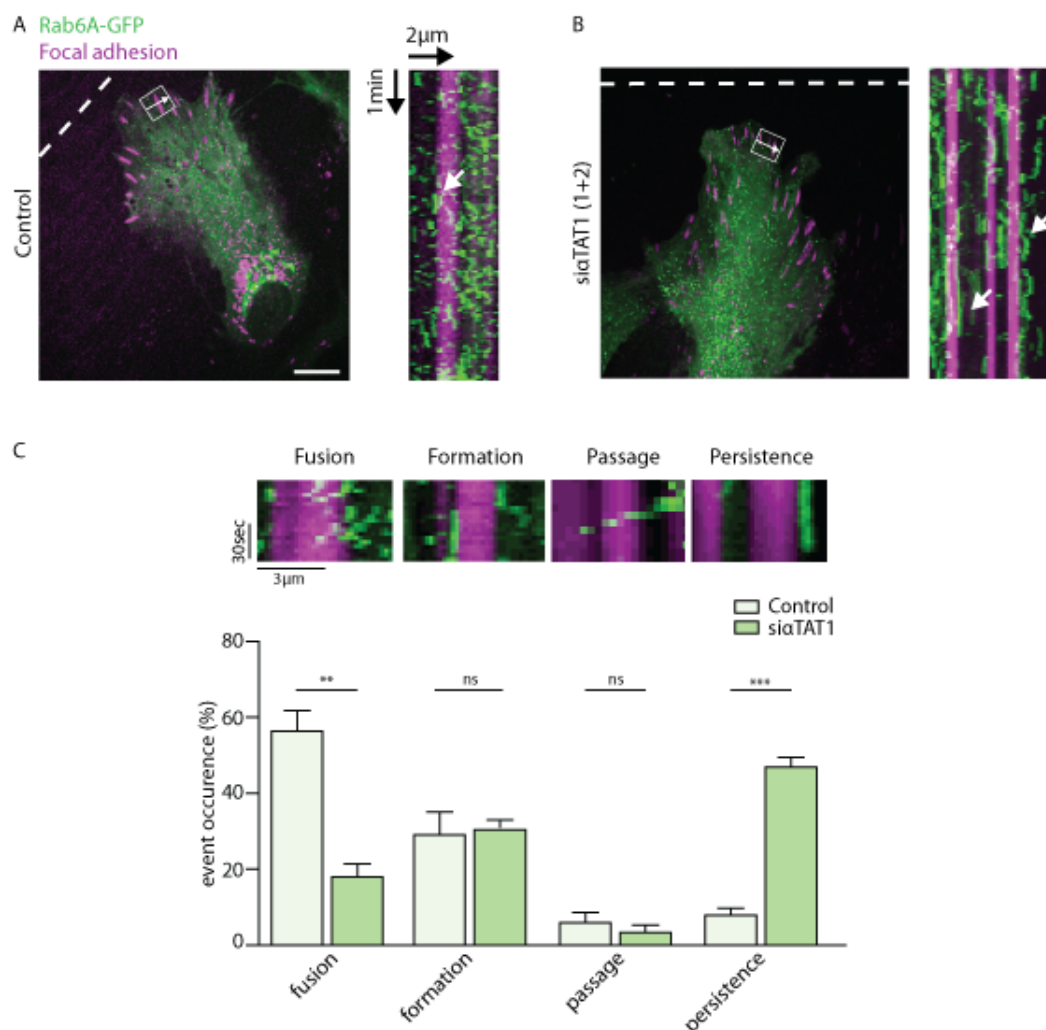


FIGURE 4.3 – la déplétion d' α TAT1 induit une perturbation de la fusion des vésicules Rab6A positives

A. Les astrocytes sur-expriment Rab6A-GFP et Paxillin-mCherry et sont transfectés avec un siRNA ciblant la Luciférase (Control) ou un siRNA ciblant α TAT1 (si α TAT1). Les astrocytes sont photographiés à intervalle régulier (5 secondes) afin d'analyser la dynamique des vésicules à proximité des plaques d'adhérence. **B.** Kymographes indiquant la localisation des vésicules Rab6A positives à proximité des plaques d'adhérence au cours du temps. **C.** Le graphique indique la proportion (%) d'évènements de fusion des vésicules Rab6A positives dans les deux conditions. (N=3, 10 plaques d'adhérence par cellule, 10 cellules par expérience, t test)

Le trafic vésiculaire dépendant de Rab6A à proximité des plaques d'adhérence régule la dynamique des sites d'adhésion

Afin de déterminer si le trafic vésiculaire dépendant de Rab6A vers les plaques d'adhérence est nécessaire à la régulation de la dynamique

des plaques d'adhérence, j'ai induit une déplétion de Rab6A dans les astrocytes, en utilisant un siRNA. Le but est de déterminer si il existe un lien fonctionnel entre le niveau d'acétylation des microtubules et Rab6A dans les astrocytes. Les cellules transfectées avec le siRNA ciblant spécifiquement Rab6A montre une diminution du niveau d'expression de la protéine, comme indiqué sur l'analyse quantitative par western blot (Figure 4.4.B).

Afin de confirmer le lien fonctionnel entre Rab6A et le niveau d'acétylation des microtubules, j'ai analysé si la diminution du niveau d'expression de Rab6A influence la dynamique des plaques d'adhérence de la même manière que dans les cellules dépourvues d' α TAT1. J'ai observé que l'absence de Rab6A induit une augmentation du nombre de plaques d'adhérence et affecte leur distribution, effets similaires aux effets de l'hypo-acétylation des microtubules (4.4.A et C). Ces résultats suggèrent qu'il existe un lien fonctionnel entre Rab6A et l'acétylation des microtubules ou la présence de la protéine α TAT1.

4.2 α TAT1 contrôle le trafic vésiculaire dépendant des Rab6A au niveau des plaques d'adhérence

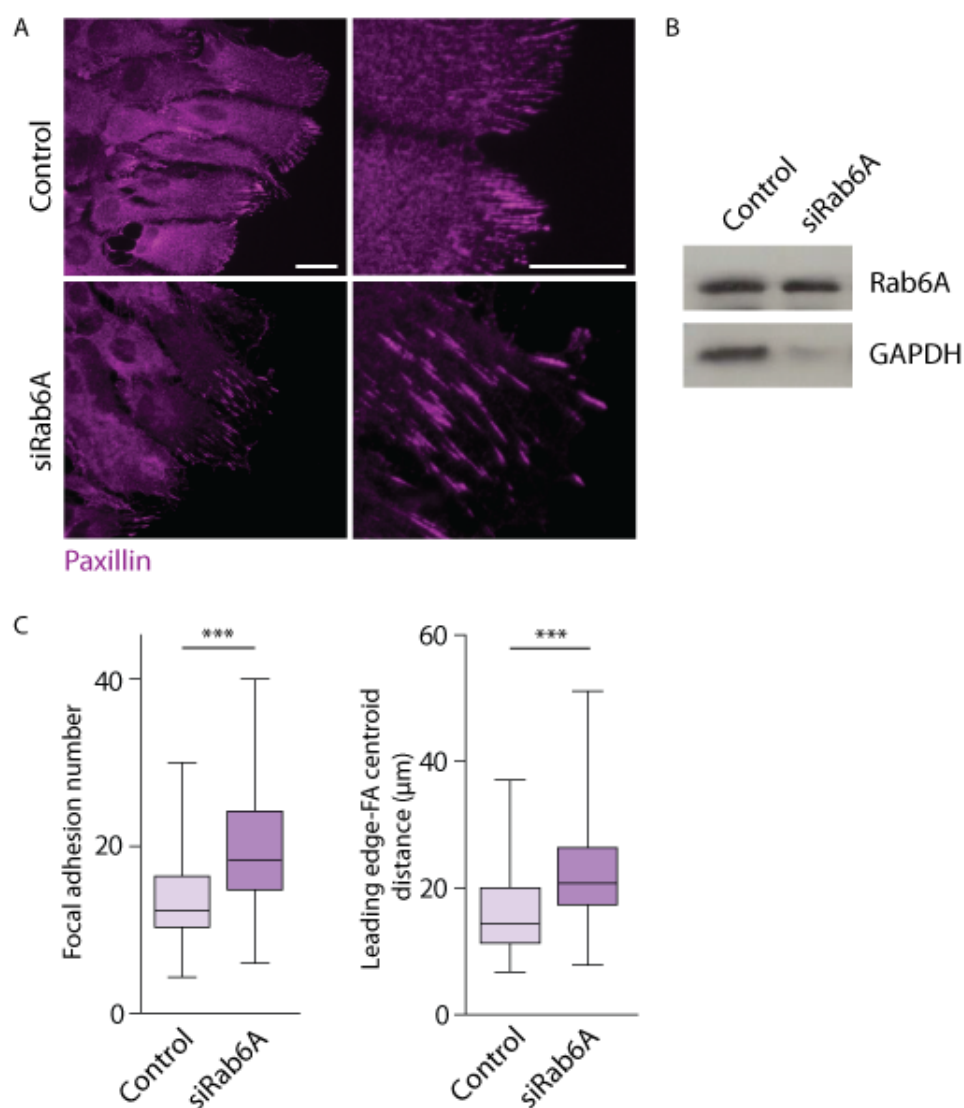


FIGURE 4.4 – Le trafic vésiculaire dépendant de Rab6A est nécessaire à la dynamique des plaques d'adhérence

A. Immunofluorescence d'astrocytes fixés après 8h de migration. Les astrocytes sont transfectés avec un siRNA ciblant la Luciférase (Control) ou MICAL3 (siMICAL3). Les plaques d'adhérence sont marquées en magenta. **B.** Analyse quantitative par western blot indiquant la diminution du niveau d'expression de Rab6A dans les cellules transfectées avec les siRNA correspondants. **C.** Graphique représentant le nombre moyen de plaques d'adhérence par cellule, et la distance moyenne entre ces plaques d'adhérence et le front de migration (N=3 100 cellules par expérience, t test).

En résumé,

- La capture des microtubules à proximité des plaques d'adhérence est nécessaire à la régulation de la dynamique des sites d'adhésions. La déplétion d' α TAT1 perturbe le recrutement de MICAL3 à proximité des plaques d'adhérence.
- Le trafic vésiculaire dépendant de Rab6A contribue à la dynamique des plaques d'adhérence. La déplétion d' α TAT1 perturbe la fusion des vésicules Rab6A positives à proximité des plaques d'adhérence.

Quatrième partie

Discussion

La polyglutamylation ne régule pas la mise en place de la polarité cellulaire dans les astrocytes

Niveau de polyglutamylation dans les cellules du système nerveux central

Les microtubules de cellules neuronales présentent un niveau élevé de polyglutamylation (Figure 1). Le rôle de cette modification dans le développement et la régénération neuronale a été identifié (Harris et al., 2000) ainsi que dans la composition et la fonction synaptique (Ikegami et al., 2007). Cependant, dans les astrocytes, cellules gliales servant de support aux neurones, la polyglutamylation semble être quasi absente. Il est possible que cette modification soit essentielle à certaines fonctions spécifiques des neurones, non assurées par les astrocytes.

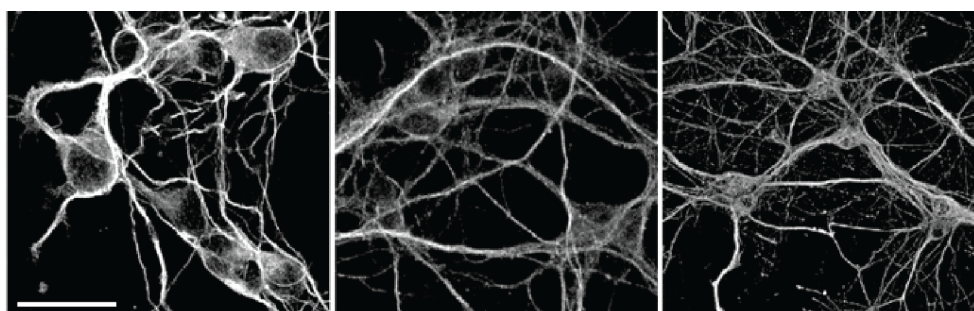


FIGURE 5 – Polyglutamylation des microtubules dans les neurones
Immunofluorescence de cellules neuronales primaires. La polyglutamylation est marquée avec l'anticorps GT335. Barre d'échelle : 20 μ m Regnard et al. (2003)

Rôle de la polyglutamylation dans la mise en place de la polarité cellulaire

J'ai étudié le rôle potentiel de la polyglutamylation des microtubules dans la mise en place de la polarité cellulaire chez les astrocytes. Pour cela j'ai diminué le niveau de polyglutamylation en utilisant deux approches, en déplaçant TLL1 et en sur-exprimant CCP5, en collaboration avec Carsten Janke. J'ai ensuite analysé l'orientation de

l'axe noyau-centrosome. Je n'ai pas observé de défaut de l'orientation de cet axe ce qui signifie que la polyglutamylation n'est pas impliquée dans la régulation de la polarité chez les astrocytes (Partie 1.2).

Rôle du cil primaire dans la migration cellulaire

Durant ma thèse, j'ai montré que le cil primaire est la principale structure polyglutamylée dans les astrocyte primaire de rat en migration. La polyglutamylation est essentielle dans la maintenance des cils (Wloga and Gaertig, 2010) et dans la mobilité des cellules flagellées (Campbell et al., 2002). J'ai aussi montré que le cil primaire est polarisé durant la migration des astrocytes (Partie 1). De manière intéressante et contrairement à ce qui a été observé dans des fibroblastes (MEF et NIH3T3) (Schneider et al., 2009), le cil primaire est orienté dans la direction inverse de la migration dans les astrocytes. Il est possible la différence d'orientation du cil dans différents types cellulaires correspond à une différence de types de signaux reçus.

L'orientation correcte du cil primaire et du centrosome en l'absence de polyglutamylation suggère que cette modification ne contribue pas à la mise en place de polarité cellulaire durant la migration des astrocytes. Cependant il est possible que le cil primaire joue quand même un rôle durant la migration des astrocytes. En effet dans de nombreux types cellulaires, cette structure joue un rôle de senseur du micro-environnement. Une étude a démontré son rôle dans plusieurs activités requises pour la migration cellulaire (Veland et al., 2014). Un défaut de ce cil induit des défauts d'organogénèse et de réparation des tissus ainsi que la formation de métastases de certaines tumeurs (Veland et al., 2014). Il serait intéressant d'étudier le rôle potentiel du cil primaire dans la migration et la mise en place de la polarité dans les astrocytes. Il est probable, cependant, que le test de blessure *in vitro* ne soit pas approprié et que le cil primaire soit impliqué dans la réception des signaux présents uniquement *in vivo*, dans un environnement cellulaire plus complexe. Il serait donc intéressant de tester le rôle du cil dans des souris KO, ou dans le modèle nouvellement développé au laboratoire chez le zébrafish.

Rôle de la polyglutamylation du réseau de microtubules

J'ai observé que le réseau de microtubules est faiblement, voir non, polyglutamylé au sein de la protrusion des astrocytes. Une stratégie pour étudier le rôle potentiel de cette modification est d'augmenter son niveau en surexprimant une TTLL. J'ai surexprimé TTLL5, une glutamylase initiatrice et j'ai observé qu'en présence de cette enzyme, le réseau de microtubules cytoplasmiques est fortement glutamylé (Figure 2). Je n'ai pas effectué d'analyse de l'orientation du centrosome et du cil primaire dans cette condition, mais il serait intéressant d'observer la conséquence de cet élévation du niveau de polyglutamylation sur la régulation de la migration astrocytaire.

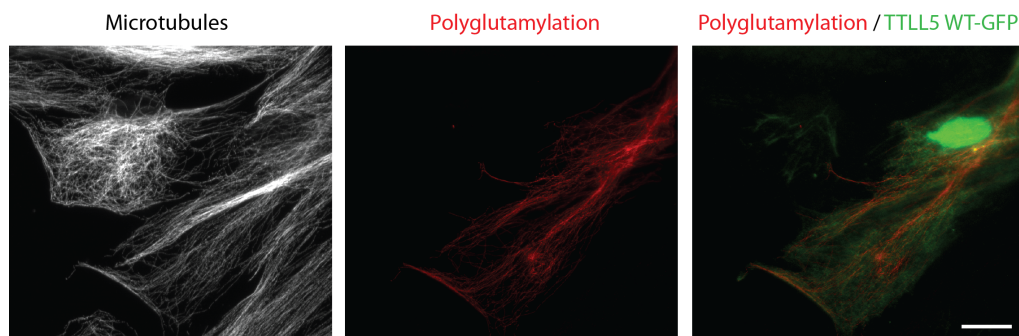


FIGURE 6 – Augmentation du niveau de polyglutamylation des microtubules dans les astrocytes qui surexpriment TTLL5

Immunofluorescence d'astrocyte après 8h de migrations. La polyglutamylation est marqué avec l'anticorps GT335 (en rouge), les microtubules (en gris) et TTLL5-GFP (en vert). Barre d'échelle : 10 μ m

Une grande diversité de TTLLs

Une de mes stratégies pour diminuer le niveau de polyglutamylation des microtubules dans les astrocytes a été de cibler une seule TTLL, TTLL1. Or il existe un grand nombre de TTLLs, ayant des spécificité de réaction et de substrat différentes. Il est possible que les autres TTLLs contribuent à la régulation de la migration cellulaire. Je n'ai pas eu le temps ni les constructions nécessaires pour poursuivre dans cette direction.

L'acétylation et la détyrosination des microtubules régulent la migration cellulaire

L'acétylation et la détyrosination des microtubules occupent des fonctions différentes

L'acétylation et la détyrosination sont deux modifications post-traductionnelles de l' α -tubuline observées généralement au niveau des microtubules âgés et stables. L'acétylation est située au niveau du résidu lysine 40 localisé sur la surface luminale des microtubules tandis que la détyrosination est située sur l'extrémité de la queue carboxy-terminale de la tubuline, localisée sur la surface externe des microtubules. Bien qu'ayant des localisations différentes au niveau de la tubuline, elles sont associées dans plusieurs études au même phénotype (Cambray-Deakin and Burgoyne, 1987b). Leurs fonctions biologiques ne sont pas complètement déterminées, cependant certains travaux ont identifié des rôles potentiels dans la régulation de l'interaction des moteurs moléculaires et des protéines associées aux microtubules (MAPs), mais aussi dans la régulation de la dynamique des microtubules.

Durant ma thèse, j'ai observé que la déplétion de l'acétyl-transférase α TAT1 induit une diminution de la vitesse de migration des astrocytes en deux dimensions. Or des résultats préliminaires effectués par Melissa Glatigny une stagiaire de M2, indiquent que la diminution du niveau de détyrosination induit une augmentation de la vitesse de migration des astrocytes. Ces résultats suggèrent que les deux modifications post-traductionnelles régulent la migration astrocytaire, mais leur modulation n'induit pas le même phénotype.

L'étude détaillée des plaques d'adhérence dans ces différentes conditions m'a permis d'identifier un rôle d' α TAT1 dans la régulation de la dynamique des plaques d'adhérence. D'autre part, la détyrosination ne semble pas réguler la dynamique des plaques d'adhérence (Partie 3).

Des différences qui pourraient s'expliquer par des différences de localisation de ces modifications

L'acétylation est située au niveau du résidu lysine 40 localisé sur la surface lumineuse des microtubules tandis que la détyrosination est située sur l'extrémité de la queue carboxy-terminale de la tubuline, localisée sur la surface externe des microtubules. Une des principales hypothèse concernant la fonction de ces modifications est leur rôle dans la modulation des interactions des moteurs moléculaires et des protéines associées aux microtubules. De part leur localisation, il est fortement probable que ces deux modifications modulent l'interaction de protéines associées différentes.

L'acétylation et la détyrosination sont généralement associées aux microtubules stables. Même si la distribution de ces modifications est sensiblement la même chez les astrocytes en migration, j'ai observé qu'elles n'étaient pas toujours localisées sur les mêmes microtubules ou qu'elles décoraient des fragments différents (Figure 3). Cependant plusieurs études (Kalebic et al., 2013), dont la mienne, suggèrent que les enzymes responsables de ces modifications seraient régulées en réponse à des signaux extérieurs. Les voies de signalisation contrôlant l'acétylation et la détyrosination pourraient donc être différentes.

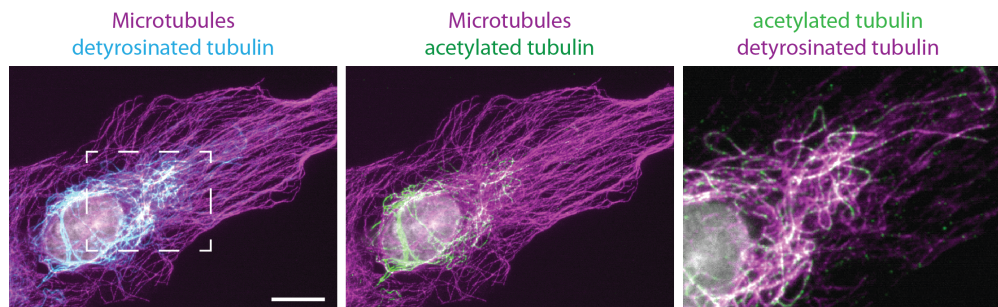


FIGURE 7 – Différences de localisation de l'acétylation et de la détyrosination des microtubules

Immunofluorescence d'astrocytes primaire de rat à 8h de migration. La détyrosination est en cyan (à gauche), l'acétylation en vert (à droite) et les microtubules en magenta (deux images de gauche). Le zoom, indiqué par le carré en pointillé à gauche, montre la superposition de l'acétylation (en vert) et de la détyrosination (en magenta). Barre d'échelle : $10\mu\text{m}$

Hypothèse sur la fonction de la détyrosination durant la migration astrocytaire

L'association de l'acétylation et la détyrosination avec les microtubules stables pourrait laisser penser qu'elles ont des fonctions sem-

blables. Pourtant, j'ai observé des effets très différents sur la migration astrocytaire (Partie 2.3).

La diminution du niveau de détyrosination induit une augmentation de la vitesse de migration des astrocytes (Partie 2.3). Cela suggère que cette modification est impliquée dans la régulation de la migration astrocytaire. Je n'ai pas observé d'effet du niveau de détyrosination des microtubules sur le nombre et la distribution des plaques d'adhérence (Partie 3). Cela signifie que la détyrosination contrôle la migration des astrocytes via un mécanisme de régulation différent de celui de l'acétylation, mais celui-ci reste à déterminer.

α TAT1 ou le niveau d'acétylation ?

Les résultats que j'ai obtenus durant ma thèse indiquent que la déplétion d' α TAT1 induit une perturbation de la dynamique des plaques d'adhérence (Partie 3). La modification du niveau global d'acétylation en modulant l'expression ou l'activité d'HDAC6 ne semble pas affecter la dynamique des sites d'adhésion. Le sauvetage phénotypique obtenu après surexpression d' α TAT1 dans les astrocytes transfectés avec un siRNA ciblant α TAT1 mais non rétabli après inhibition d'HDAC6 par ajout de tubacine indique que l'acétyltransférase, plus que l'acétylation des microtubules, joue un rôle crucial dans la régulation de la dynamique des plaques d'adhérence. De plus, la localisation d' α TAT1 au niveau des plaques d'adhérence semble confirmer cette hypothèse.

Il n'existe pas d'anticorps reconnaissant spécifiquement α TAT1 permettant une observation de la protéine endogène par immunomarquage. L'observation de la localisation de l'enzyme que j'ai faite a été effectuée dans un contexte de surexpression de l'acétyltransférase couplée à la GFP. Afin de confirmer la localisation de l'enzyme, je clone actuellement α TAT1 fusionnée à une autre protéine fluorescente afin d'éliminer ou valider la possible contribution du tag dans la localisation de l'enzyme.

Afin de confirmer qu' α TAT1, et non le niveau d'acétylation des microtubules, régule la dynamique des plaques d'adhérence, j'ai surexprimé la tubuline dont le résidu lysine 40 est muté et non acétylable par α TAT1. Cependant la surexpression de la tubuline sous cette forme

n'a pas fonctionné, probablement en raison d'un problème d'incorporation de la tubuline fusionnée à la GFP dans la matrice de microtubules en raison de sa taille. J'ai donc cloné cette tubuline avec un tag HA beaucoup plus petit. Malheureusement la surexpression de la tubuline mutée n'induit pas de diminution du niveau d'acétylation (Figure 4), probablement en raison d'un problème d'incorporation de la sous-unité mutée dans la matrice des microtubules. Cette expérience aurait pu confirmer le rôle spécifique d' α TAT1 dans la régulation de la dynamique des plaques d'adhérence.



FIGURE 8 – La surexpression de la tubuline mutée au niveau de la lysine 40 n'induit pas de diminution du niveau d'acétylation

Immunofluorescence d'astrocytes primaire de rat. Les microtubules sont en cyan, l'acétylation en vert et la tubuline mutée K40R fusionnée au tag HA en magenta. Barre d'échelle : 10 μ m

Même s'il est difficile de conclure définitivement, mes résultats suggèrent très fortement que c'est la localisation de l'enzyme α TAT1 plutôt que l'acétylation des microtubules qui contrôlerait le trafic membranaire vers les plaques d'adhérence et la migration cellulaire. L'acétylation des microtubules ne serait alors qu'une autre conséquence de la régulation d' α TAT1, indépendant du contrôle de la migration.

α TAT1 régule la dynamique des microtubules à proximité des plaques d'adhérence

Les microtubules et les plaques d'adhérence, une association étroite.

Il a été démontré que les microtubules peuvent cibler spécifiquement et à maintes reprises les plaques d'adhérences matures (Kaverina et al., 1998; Krylyshkina et al., 2003). L'instabilité dynamique permet aux microtubules d'individuellement s'associer plusieurs fois à certaines plaques d'adhérence (Kaverina et al., 1998) et cette association s'effectue plus fréquemment dans les zones de désassemblage des sites d'adhésion (Rid et al., 2005). De plus, l'observation des microtubules en TIRF a montré que leur extrémité "+" se situait à proximité (<10nm) de la membrane plasmique au niveau des plaques d'adhérence (Ezratty et al., 2005). Le mécanisme qui permet aux microtubules de reconnaître et interagir avec les plaques d'adhérence à désassembler n'est pas entièrement résolu mais pourrait impliquer le contrôle du trafic membranaire (Ezratty et al., 2009) et/ou la signalisation, en particulier par les petites protéines G (p190Rho, RhoGEFH) (Etienne-Manneville, 2013b)

L'interaction entre les microtubules et les plaques d'adhérence affecte aussi la stabilité des microtubules. En effet, chaque interaction entre les microtubules et les plaques d'adhérence est associée à une pause de la polymérisation des microtubules suivie d'une rapide dépolymérisation et d'un désassemblage de la plaque d'adhérence ciblée. Le mécanisme moléculaire n'est pas totalement compris.

Dans les astrocytes, j'ai observé une étroite association entre les microtubules et les plaques d'adhérence durant la migration. Les microtubules semblent se situer à proximité des plaques d'adhérence durant leur cycle de vie, ce qui confirme leur rôle dans la régulation de la dynamique des sites d'adhésion (Partie 3). Les microtubules présents près des plaques d'adhérence sont acétylés. La déplétion d' α TAT1 perturbe la dynamique des plaques d'adhérence, ce qui suggère un rôle prépondérant d' α TAT1 dans la régulation de leur dynamique.

L'acétylation, un marqueur de stabilité ?

Aucune étude *in vivo* n'a démontré de lien direct entre le niveau d'acétylation des microtubules et leur stabilité. Dans les astrocytes, le niveau le plus élevé d'acétylation se situe sur les microtubules autour du noyau et du centrosome, siège principal de la polymérisation des microtubules et donc ceux les plus "âgés". Il est donc possible qu'il existe une corrélation entre le niveau d'acétylation des microtubules et leur dynamique.

J'ai montré qu'APC favorise la stabilité des microtubules en général et contrôle l'acétylation des microtubules à l'extrémité positive des microtubules (Partie 3). Il reste à déterminer si APC contrôle la localisation ou l'activité d' α TAT1 et s'il peut interagir physiquement avec cette enzyme. La localisation à l'extrémité positive des microtubules à l'avant des astrocytes en migration est contrôlée par la voie Cdc42/Par6/aPKC/GSK3. Dans une prochaine étape, nous allons vérifier l'implication de cette voie dans le recrutement d' α TAT1 et l'acétylation des microtubules.

α TAT1 régule la capture des microtubules à proximité des plaques d'adhérence

α TAT1 contrôle le recrutement de MICAL3

La stabilisation et la capture des microtubules au front de migration, au niveau de la membrane plasmique, sont nécessaires à la régulation de la dynamique des plaques d'adhérence durant la migration. La localisation des microtubules à proximité des sites d'adhésion permet de contrôler l'exocytose et l'endocytose localisée de composants nécessaires à leur dynamique. Diverses protéines contribuent à la capture des microtubules à proximité des plaques d'adhérence, telles que ELK, LL5 β et MICAL3. J'ai observé une localisation d'ELK et MICAL3 à proximité des plaques d'adhérence. De façon intéressante, MICAL3 décore les sites d'adhésion durant la migration (Partie 4). Cette protéine est recrutée à proximité des plaques de leur assemblage à leur désassemblage. La déplétion d' α TAT1 perturbe le recrutement de MICAL3 à proximité des plaques d'adhérence. Cela signifie que la capture des microtubules est affectée au niveau de la membrane plasmique. La perturbation de la capture des microtubules à proximité des plaques d'adhérence peut possiblement perturber le trafic dépendant des microtubules nécessaires à la migration.

Lien réciproque possible entre l'acétylation des microtubules par α TAT1 et MICAL3

La destabilisation des microtubules à l'avant des astrocytes suite à la déplétion d'APC induit une diminution du niveau d'acétylation des microtubules. J'ai analysé si la déplétion de MICAL3 par siRNA qui doit induire une perturbation de la capture des microtubules à la membrane, induit une hypo-acétylation des microtubules destabilisés. J'ai observé une diminution du niveau d'acétylation des microtubules dans les astrocytes transfectés avec siMICAL3 (Figure 5). Cela suggère que la capture des microtubules à proximité des plaques d'adhérence induit possiblement une acétylation des microtubules, potentiellement

en les stabilisant. Cela peut aussi suggérer que la capture des microtubules permet le recrutement d' α TAT1 au niveau des sites d'adhésion afin d'acétyler les microtubules mais je ne peux pas le vérifier faute d'anticorps reconnaissant spécifiquement α TAT1.

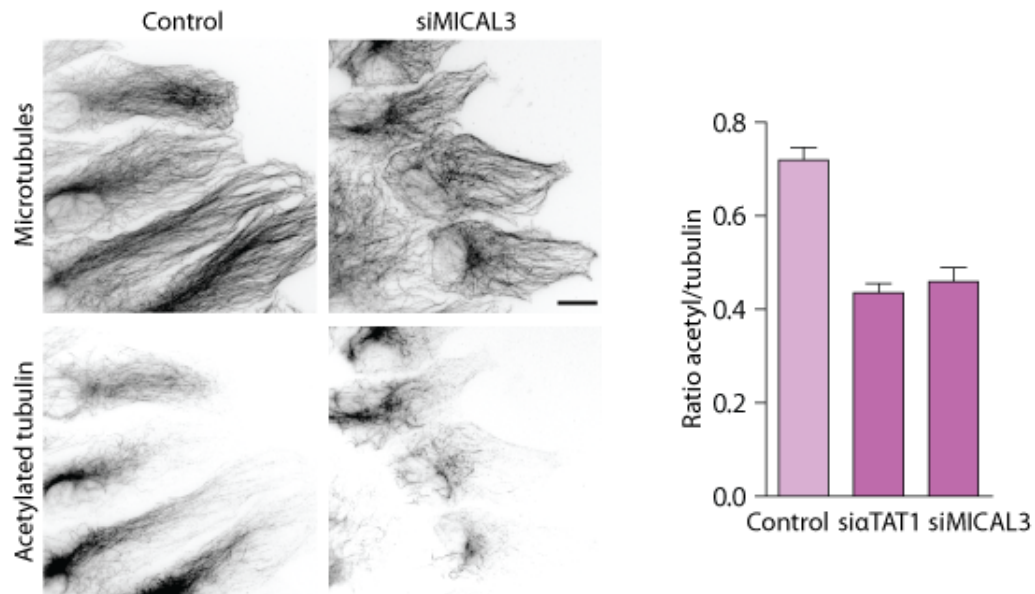


FIGURE 9 – La déplétion de MICAL3 induit une diminution du niveau d'acétylation des microtubules

A. Immunofluorescence d'astrocytes après 8h de migration. Les astrocytes sont transfectés avec un siRNA control ou siMICAL3. Les microtubules et l'acétylation des microtubules sont en contraste inversé. A droite le graphique représente le ratio entre la quantité de microtubules acétylés et la quantité de microtubules totale. Barre d'échelle : 10 μ m (n=1, 100 cellules par condition)

APC et la capture des microtubules

APC est impliquée dans la stabilisation des microtubules au front de migration et régule ainsi leur dynamique (Partie 3). Afin de savoir si c'est un défaut de la dynamique des microtubules qui affecte la capture des microtubules à proximité des plaques d'adhérence, j'étudie actuellement la localisation de MICAL3 dans les astrocytes déplétées en APC. Je devrais normalement obtenir un défaut de recrutement de MICAL3 à proximité des plaques d'adhérence.

α TAT1 régule le trafic vésiculaire dépendant de Rab6A vers les plaques d'adhérence

α TAT1 régule l'exocytose vers les plaques d'adhérence

Rab6A contribue à la régulation du transport des protéines à partir de l'appareil de Golgi au réticulum endoplasmique (Matanis et al., 2002; Monier et al., 2002). Elle est aussi impliquée dans l'exocytose et le trafic membranaire dépendant des microtubules (Grigoriev et al., 2007, 2011). Il a été démontré que la capture des microtubules à proximité des plaques d'adhérence est nécessaire pour l'exocytose localisée impliquée dans la dynamique des plaques d'adhérence et les vésicules rab6A positives sont exocytées à proximité des plaques d'adhérence (Stehbens et al., 2014). J'ai étudié le trafic des vésicules Rab6A positives, en collaboration avec Bruno Goud, et confirmé l'exocytose localisée de ces cargos dans les astrocytes. J'ai montré que les vésicules Rab6A positives sont transportées à proximité des plaques d'adhérence et sont exocytées. La déplétion d' α TAT1 induit une persistance des vésicules à proximité des sites d'adhésion, ce qui indique un rôle d' α TAT1 dans la régulation de la fusion des vésicules d'exocytose (Partie 4). Dans une étude précédente (Grigoriev et al., 2011), la capture des microtubules au cortex par MICAL3 ne régule pas uniquement la fusion des vésicules d'exocytose Rab6A-positives. MICAL3 et ELK régulent aussi la fusion des vésicules Rab8-positives. J'étudie actuellement le rôle d' α TAT1 dans la régulation de la fusion des vésicules Rab8-positives.

L'acétylation des microtubules par α TAT1 et l'endocytose des intégrines

L'endocytose des intégrines est essentielle dans la dynamique des plaques d'adhérence. Les microtubules contribuent à la régulation du recyclage des intégrines en régulant les composants nécessaires à leur endocytose (Ezratty et al., 2005, 2009) et les voies de signalisation impliquées (Palazzo et al., 2004). L'acétyltransférase α TAT1 est localisée au niveau des puits de clathrine car elle interagit directement avec AP2, adaptateur essentiel pour l'endocytose des intégrines et l'endocytose

dépendante de la clathrine, ce qui contribue à la dynamique des plaques d'adhérence (Ezratty et al., 2009). Pour étudier le rôle d' α TAT1 dans le trafic des intégrines, j'ai commencé à étudier ce trafic vers les plaques d'adhérence ainsi que leur recyclage en utilisant le système RUSH, en collaboration avec Franck Perez. Ce système permet la synchronisation et la visualisation du trafic des protéines vers la membrane plasmique (Boncompain et al., 2012).

La capture des microtubules et l'exocytose localisée

Les protéines ELK et MICAL contribuent à la capture des microtubules à proximité des plaques d'adhérence et régulent la fusion des vésicules Rab6A et Rab8 positives avec la membrane plasmique (Grigoriev et al., 2011). Afin de confirmer le rôle d' α TAT1 dans le trafic membranaire à proximité des plaques d'adhérence, j'étudie actuellement le trafic de Rab8 dans les astrocytes en migration en absence d' α TAT1.

Afin de confirmer le rôle crucial de MICAL3 dans l'exocytose localisée des vésicules Rab6A positives nécessaire à la régulation de la dynamique des plaques d'adhérence, j'ai entrepris d'analyser le trafic membranaire de Rab6A dans les astrocytes en absence de MICAL3. Je devrais obtenir un défaut de la fusion des vésicules d'exocytose Rab6A-positives similaire à celui observé en absence d' α TAT1.

modèle pour la régulation de la dynamique des plaques d'adhérence par α TAT1

Le contrôle de l'exocytose à proximité des plaques d'adhérence est essentiel pour réguler leur dynamique. Les microtubules contribuent à la régulation de ce processus en régulant le trafic vers les sites d'adhésions. Les microtubules sont localisés à proximité des plaques d'adhérence via leur capture au niveau de la membrane plasmique. Les protéines ELK, LL5 β et MICAL3 contribuent à cette capture.

D'après les résultats que j'ai obtenus durant ma thèse, α TAT1 régule la dynamique des plaques d'adhérence au cours de la migration des astrocytes. De part sa localisation au niveau des sites d'adhésion, α TAT1 aide au recrutement de MICAL3 autour des plaques d'adhérence nécessaire à la capture des microtubules à proximité des plaques d'adhérence. La localisation des microtubules au niveau du cortex contribue à la fusion des vésicules d'exocytose Rab6A-positives avec la membrane plasmique. La capture des microtubules à proximité des plaques d'adhérence pourrait induire leur acétylation préférentielle afin de contribuer à leur stabilisation par l'intermédiaire d'APC, protéine interagissant avec EB1.

Mon travail de thèse apporte une information sur le mécanisme de régulation de la dynamique des plaques d'adhérence par les microtubules au cours de la migration des astrocytes, ainsi qu'une fonction de l'acétyltransférase α TAT1 dans la régulation de la fonction des microtubules

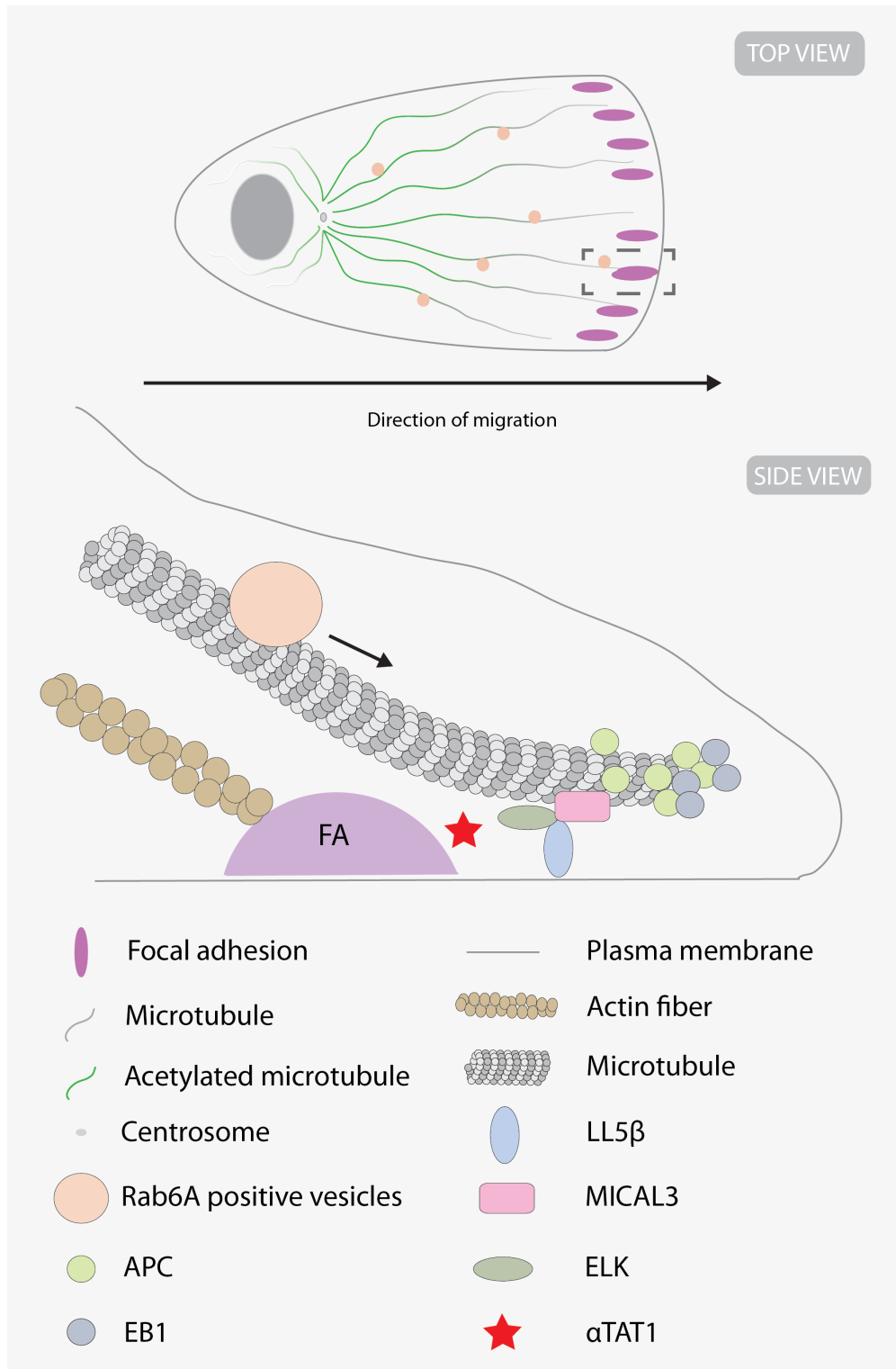


FIGURE 10 – Modèle de régulation de la dynamique des plaques d'adhérence par l'acétylation des microtubules

Cinquième partie
Matériels et méthodes

Culture cellulaire et essai de migration

Les primaires de rat sont cultivé selon un protocole décrit (Etienne-Manneville, 2006) selon les règles établies par le ministère français de l'agriculture, suivant les standards européen.

Pour les essais de migration en deux dimensions par test de blessure, les cellules sont cultivées sur des lamelles de verre de 35mm, destinées à l'immunofluorescence, ou des boites (MatTek), pour la vidéomicroscopie, recouvertes de poly-L-ornithine. Les cellules sont cultivées jusqu'à confluence. Le précédent l'expérience le milieu de culture est renouvelé. Le jour de l'expérience, une blessure sur la monocouche est effectué à l'aide d'un cone de P200, formant une ouverture de la monocouche d'environ 300-500nm afin d'initier la migration des astrocytes.

Drogues utilisées

La Tubacine, inhibiteur d'HDAC6, et la Niltubacine, son homologue inactif, utilisés durant ma thèse ont été ajouté au milieu de culture au moment où la blessure est effectuée.

Western blot

Pour les western blot, les lysats ont été obtenus en utilisant un buffer Laemmli contenant 60mM de Tris-HCl pH 6.8, 10% de glycérol, 2% de SDS et 50mM de dithiothreitol. Les protéines sont séparées par un gel 10%. Les différents anticorps ainsi que les dilutions utilisées sont détaillés dans le tableau des anticorps.

Immunofluorescence

Pour les immunofluorescence, les astrocytes sont fixés au méthanol à -20 ou avec du Paraformaldéhyde 4%. Les anticorps et les concentrations utilisées sont détaillés dans le tableau des anticorps.

Pour les immunofluorescence effectuées pour l'étude de la polyglutamylation, les astrocytes sont fixés avec un protocole définit dans (Magiera and Janke, 2013)

Liste des anticorps

Anticorps anti-	Espèce/Mono ou Polyclonal	Fournisseur	Fixation concentration IF	Concentration WB
Acetyl-tubuline	Mouse M	Sigma clone 6-11B-1	MetOH 1/7500	1/15000
α -tubuline	Rat M	Adb Serotec MCA77G	MetOH 1/500	1/1000
α TAT1	Rabbit P	Abcam ab58742	not for IF	
APC	Rabbit M	Gift from Nathke	MetOH 1/1000	1/100
Arl13b	Rabbit P	Proteintech 17711-1-AP	MetOH/PFA 1/200	
B3	Mouse M	Abcam ab113224	MetOH 1/5000	
β -actine	Mouse M	Sigma A2228	PFA	1/10000
γ -tubuline	Mouse M	Sigma T6557	MetOH/PFA 1/400	
GAPDH	Mouse M	Chemicon International MAB374		1/10000
GFP-FITC	Goat	Abcam		MetOH/PFA 1/1000
GFP-FITC	Rabbit P			MetOH/PFA 1/1000
GFP-HRP	Goat P	Abcam ab6663		1/3000
Glu-tubuline	Rabbi P	AbCys	MetOH 1/500	1/1000
GM130	Rabbit P	BD Transduction 610823	PFA 1/200	
GT335	Mouse M	AdipoGen AG-20B-0020-C100	MetOH/PFA 1/15000	1/15000

Anticorps anti-	Espèce/Mono ou Polyclonal	Fournisseur	Fixation concentration IF	Concentration WB
HA	Rat M	Roche 11867423001	MetOH/PFA 1/1000	1/1000
GFP-HRP	Goat P	Abcam ab6663		1/3000
MICAL3	Rabbit P	Merck Millipore		1/500
N-cadhérine	Rabbit P	Abcam ab12221-100 (lot 350009)	MetOH/PFA 1/1000	
Pan-Cadherine	Mouse M	Sigma C1821	MetOH/PFA 1/500	
Paxilline	Mouse M	BD Transduction	PFA 1/500	
Pericentrine	Rabbit P	Covance PRB 432-C	MetOH/PFA 1/500	
PolyE	Rabbit P	Gift from C. Janke	1/1000	
Rab6A	Rabbit P	Santa Cruz Gift from B.Goud		1/500
R17	Rabbit P	Gift from C. Janke	1/1000	
R20	Rabbit P	Gift from C. Janke	1/1000	
Taline	Mouse M	Sigma T3287	MetOH 1/1000	

Liste des siRNAs

Name	Accession number	Starting position	Sequence
siLuciférase	KX650485	528	5'-UAA GGC UAU GAA GAG AUA C-3'
siGFP			5'-3'
si α TAT1(1)	NM212498.1	218	5'-ACCGACACGUUAUUUAUGU-3'
si α TAT1(2)	NM212498.1	1226	5'-UUCGAAACCUGCAGGAACG-3'
si α TAT1(3)	NM212498.1	1461	5'-UAA UGG AUG UAC UCA UUC A-3'
si α TAT1(4)	NM212498.1	173	5'-UCA UGA CUA UUG UAG AUG A-3'
siAPC(3)	NM012499.1	141	5'-CAC CAU GUG GAU CAG CCU A-3'
siAPC(4)	NM012499.1	5200	5'-CAG AGG AAG GAG AUA UUC-3'
siRAB6A (1)	XM006229794	658	5'-GCA ACA AUU GGC AUU GAC UUC UUA U-3'
siRAB6A (2)	XM006229794	1364	5'-CAA ACA AUU CCA GCA UAC UCG UGA U-3'
siMICAL3 (1)	NM001191085	888	5'-UCU UGG GCA UUG AAA UUC AUG UCA A-3'
siMICAL3 (2)	NM001191085	1220	5'-GGU AUC GAC UUA GAG AAC AUC GUC U-3'

Liste des constructions

Name	espèce	Source
α TAT1-GFP	human	gift from Philippe Chavrier
α TAT1D157N-GFP	human	gift from Philippe Chavrier
HDAC6-Flag	human	gift from Philippe Chavrier
GFP		
Paxillin-GFP	chicken	
Paxillin-mCherry	chicken	
Rab6A-GFP	human	gift from Bruno Goud
hTTL-GFP	human	gift from Carsten Janke
TubulinK40R-HA	human	
MICAL3-GFP	XM006229794	gift from Anna Akhmanova
ELK-GFP	XM006229794	gift from Anna Akhmanova

Bibliographie

- Aberle, H., S. Butz, J. Stappert, H. Weissig, R. Kemler, and H. Hoshuetzky (1994). Assembly of the cadherin-catenin complex in vitro with recombinant proteins. *Journal of cell science* 107 (Pt 1, 3655–3663.
- Aguilar, A., L. Becker, T. Tedeschi, S. Heller, C. Iomini, and M. V. Nachury (2014). α -Tubulin K40 Acetylation is Required for Contact Inhibition of Proliferation and Cell-Substrate Adhesion. *Molecular biology of the cell*, 1–31.
- Akella, J. S., D. Wloga, J. Kim, N. G. Starostina, S. Lyons-Abbott, N. S. Morrissette, S. T. Dougan, E. T. Kipreos, and J. Gaertig (2010). MEC-17 is an alpha-tubulin acetyltransferase. *Nature* 467, 218–222.
- Akhmanova, A. and M. O. Steinmetz (2008). Tracking the ends : a dynamic protein network controls the fate of microtubule tips. *Nature reviews. Molecular cell biology* 9, 309–322.
- Akhmanova, A. and M. O. Steinmetz (2015). Control of microtubule organization and dynamics : two ends in the limelight. *Nature reviews. Molecular cell biology* 16, 711–26.
- Al-Bassam, J. and K. D. Corbett (2012). -Tubulin acetylation from the inside out. *Proceedings of the National Academy of Sciences* 109, 19515–19516.
- Al-Bassam, J., H. Kim, G. Brouhard, A. van Oijen, S. C. Harrison, and F. Chang (2010). CLASP promotes microtubule rescue by recruiting tubulin dimers to the microtubule. *Developmental Cell* 19, 245–258.
- Alexandrova, A. Y., K. Arnold, S. Schaub, J. M. Vasiliev, J. J. Meister, A. D. Bershadsky, and A. B. Verkhovsky (2008). Comparative

-
- dynamics of retrograde actin flow and focal adhesions : Formation of nascent adhesions triggers transition from fast to slow flow. *PLoS ONE* 3.
- Alushin, G. M., G. C. Lander, E. H. Kellogg, R. Zhang, D. Baker, and E. Nogales (2014). High-Resolution microtubule structures reveal the structural transitions in β -tubulin upon GTP hydrolysis. *Cell* 157, 1117–1129.
- Aoki, K. and M. M. Taketo (2007). Adenomatous polyposis coli (APC) : a multi-functional tumor suppressor gene. *Journal of Cell Science* 120, 3327–3335.
- Arboleda-Estudillo, Y., M. Krieg, J. Stühmer, N. A. Licata, D. J. Muller, and C. P. Heisenberg (2010). Movement Directionality in Collective Migration of Germ Layer Progenitors. *Current Biology* 20, 161–169.
- Arce, C. a. and H. S. Barra (1983). Association of tubuliny-tyrosine carboxypeptidase with microtubules. *FEBS Letters* 157(1), 75–78.
- Argarana, C. E., H. S. Barra, and R. Caputto (1980). Tubuliny-tyrosine carboxypeptidase from chicken brain : properties and partial purification. *Journal of neurochemistry* 34, 114–118.
- Arias-Salgado, E. G., S. Lizano, S. Sarkar, J. S. Brugge, M. H. Ginsberg, and S. J. Shattil (2003). Src kinase activation by direct interaction with the integrin beta cytoplasmic domain. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 100, 13298–13302.
- Arjonen, A., J. Alanko, S. Veltel, and J. Ivaska (2012). Distinct Recycling of Active and Inactive β 1 Integrins. *Traffic* 13(1), 610–625.
- Arsenault, D., K. Brochu-Gaudreau, M. Charbonneau, and C. M. Dubois (2013). HDAC6 Deacetylase Activity Is Required for Hypoxia-Induced Invadopodia Formation and Cell Invasion. *PLoS ONE* 8.
- Assaker, G., D. Ramel, S. K. Wculek, M. González-Gaitán, and G. Emery (2010). Spatial restriction of receptor tyrosine kinase activity through a polarized endocytic cycle controls border cell

migration. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 107, 22558–63.

Audebert, S., A. Koulakoff, Y. Berwald-Netter, F. Gros, P. Denoulet, and B. Eddé (1994). Developmental regulation of polyglutamylated alpha- and beta-tubulin in mouse brain neurons. *Journal of cell science* 107 (Pt 8, 2313–22.

Aumeier, C., L. Schaedel, J. Gaillard, K. John, L. Blanchoin, and M. Théry (2016). Self-repair promotes microtubule rescue. *Nature Cell Biology* 18, 1054–1064.

Baas, P. W. and M. M. Black (1990). Individual microtubules in the axon consist of domains that differ in both composition and stability. *Journal of Cell Biology* 111, 495–509.

Badin-Larçon, a. C., C. Boscheron, J. M. Soleilhac, M. Piel, C. Mann, E. Denarier, A. Fourest-Lieuvin, L. Lafanechère, M. Bornens, and D. Job (2004). Suppression of nuclear oscillations in *Saccharomyces cerevisiae* expressing Glu tubulin. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 101, 5577–82.

Bae, K., D. W. Bruner, S. Baek, B. Movsas, B. W. Corn, and J. J. Dignam (2011). Patterns of missing mini mental status exam (MMSE) in radiation therapy oncology group (RTOG) brain cancer trials. *Journal of Neuro-Oncology* 105, 383–395.

Balaban, N. Q., U. S. Schwarz, D. Riveline, P. Goichberg, G. Tzur, I. Sabanay, D. Mahalu, S. Safran, A. Bershadsky, L. Addadi, and B. Geiger (2001). Force and focal adhesion assembly : a close relationship studied using elastic micropatterned substrates. *Nature cell biology* 3, 466–472.

Bali, P., M. Pranpat, J. Bradner, M. Balasis, W. Fiskus, F. Guo, K. Rocha, S. Kumaraswamy, S. Boyapalle, P. Atadja, E. Seto, and K. Bhalla (2005). Inhibition of histone deacetylase 6 acetylates and disrupts the chaperone function of heat shock protein 90 : A novel basis for antileukemia activity of histone deacetylase inhibitors. *Journal of Biological Chemistry* 280, 26729–26734.

-
- Ballestrem, C., B. Hinz, B. A. Imhof, and B. Wehrle-Haller (2001). Marching at the front and dragging behind : Differential $\alpha 5$ -integrin turnover regulates focal adhesion behavior. *Journal of Cell Biology* 155, 1319–1332.
- Barber, M. A. and H. C. Welch (2006). PI3K and RAC signalling in leukocyte and cancer cell migration.
- Barra, H. S., J. a. Rodriguez, C. a. Arce, and R. Caputto (1973). A soluble preparation from rat brain that incorporates into its own proteins (14 C) arginine by a ribonuclease-sensitive system and (14 C)tyrosine by a ribonuclease-insensitive system. *Journal of Neurochemistry* 20, 97–108.
- Barth, A. I. M., H. Y. Caro-Gonzalez, and W. J. Nelson (2008). Role of adenomatous polyposis coli (APC) and microtubules in directional cell migration and neuronal polarization.
- Bartolini, F. and G. G. Gundersen (2006). Generation of noncentrosomal microtubule arrays. *Journal of cell science* 119, 4155–63.
- Bazellieres, E., V. Conte, A. Elosegui-Artola, X. Serra-Picamal, M. Bintanel-Morcillo, P. Roca-Cusachs, J. J. Muñoz, M. Sales-Pardo, R. Guimerà, and X. Trepat (2015). Control of cell-cell forces and collective cell dynamics by the intercellular adhesome. *Nature cell biology* 17, 409–420.
- Bell, P. J. and B. Safiejko-Mroczka (1995). Improved methods for preserving macromolecular structures and visualizing them by fluorescence and scanning electron microscopy. *Scanning microscopy* 9, 843–57; discussion 858–60.
- Belmadani, S., C. Poüs, R. Fischmeister, and P. F. Méry (2004). Post-translational modifications of tubulin and microtubule stability in adult rat ventricular myocytes and immortalized HL-1 cardiomyocytes. *Molecular and Cellular Biochemistry* 258, 35–48.
- Beningo, K. A., M. Dembo, I. Kaverina, J. V. Small, and Y. L. Wang (2001). Nascent focal adhesions are responsible for the generation of strong propulsive forces in migrating fibroblasts. *Journal of Cell Biology* 153, 881–887.

-
- Berezniuk, I., H. T. Vu, P. J. Lyons, J. J. Sironi, H. Xiao, B. Burd, M. Setou, R. H. Angeletti, K. Ikegami, and L. D. Fricker (2012). Cytosolic carboxypeptidase 1 is involved in processing α - and β -tubulin. *Journal of Biological Chemistry* 287, 6503–6517.
- Bergert, M., A. Erzberger, R. A. Desai, I. M. Aspalter, A. C. Oates, G. Charras, G. Salbreux, and E. K. Paluch (2015). Force transmission during adhesion-independent migration. *Nature Cell Biology* 17, 524–529.
- Bershadsky, A. D., I. S. Tint, A. A. Neyfakh, and J. M. Vasiliev (1985). Focal contacts of normal and RSV-transformed quail cells. Hypothesis of the transformation-induced deficient maturation of focal contacts. *Experimental Cell Research* 158, 433–444.
- Bertos, N. R., B. Gilquin, G. K. T. Chan, T. J. Yen, S. Khochbin, and X. J. Yang (2004). Role of the tetradecapeptide repeat domain of human histone deacetylase 6 in cytoplasmic retention. *Journal of Biological Chemistry* 279, 48246–48254.
- Bieling, P., S. Kandels-Lewis, I. A. Telley, J. Van Dijk, C. Janke, and T. Surrey (2008). CLIP-170 tracks growing microtubule ends by dynamically recognizing composite EB1/tubulinbinding sites. *Journal of Cell Biology* 183, 1223–1233.
- Bieling, P., L. Laan, H. Schek, E. L. Munteanu, L. Sandblad, M. Dogterom, D. Brunner, and T. Surrey (2007). Reconstitution of a microtubule plus-end tracking system in vitro. *Nature* 450, 1100–1105.
- Bobinnec, Y., A. Khodjakov, L. M. Mir, C. L. Rieder, B. Eddé, and M. Bornens (1998). Centriole disassembly in vivo and its effect on centrosome structure and function in vertebrate cells. *Journal of Cell Biology* 143, 1575–1589.
- Boettiger, D. (2012). Mechanical control of integrin-mediated adhesion and signaling.
- Boggs, A. E., M. I. Vitolo, R. A. Whipple, M. S. Charpentier, O. G. Goloubeva, O. B. Ioffe, K. C. Tuttle, J. Slovic, Y. Lu, G. B. Mills, and S. S. Martin (2015). α -Tubulin acetylation elevated in metastatic and basal-like breast cancer cells promotes microtentacle formation, adhesion, and invasive migration. *Cancer Research* 75, 203–215.
-

-
- Boncompain, G., S. Divoux, N. Gareil, H. de Forges, A. Lescure, L. Latreche, V. Mercanti, F. Jollivet, G. Raposo, and F. Perez (2012). Synchronization of secretory protein traffic in populations of cells. *Nature Methods* 9(5), 493–498.
- Bonnet, C., D. Boucher, S. Lazereg, B. Pedrotti, K. Islam, P. Denoulet, and J. C. Larcher (2001). Differential Binding Regulation of Microtubule-associated Proteins MAP1A, MAP1B, and MAP2 by Tubulin Polyglutamylation. *Journal of Biological Chemistry* 276, 12839–12848.
- Borghi, N., M. Lowndes, V. Maruthamuthu, M. L. Gardel, and W. J. Nelson (2010). Regulation of cell motile behavior by crosstalk between cadherin- and integrin-mediated adhesions. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 107, 13324–9.
- Bouchet-Marquis, C., B. Zuber, A.-M. Glynn, M. Eltsov, M. Grabenbauer, K. N. Goldie, D. Thomas, A. S. Frangakis, J. Dubochet, and D. Chrétien (2007). Visualization of cell microtubules in their native state. *Biology of the cell / under the auspices of the European Cell Biology Organization* 99, 45–53.
- Boyle, P., B. Levin, and W. H. O. Press (2008). World Cancer Report 2008.
- Brady, S. T., M. Tytell, and R. J. Lasek (1984). Axonal tubulin and axonal microtubules : Biochemical evidence for cold stability. *Journal of Cell Biology* 99, 1716–1724.
- Brandt, D. T. and R. Grosse (2007). Get to grips : steering local actin dynamics with IQGAPs. *EMBO reports* 8, 1019–1023.
- Brangwynne, C. P., F. C. MacKintosh, and D. a. Weitz (2007). Force fluctuations and polymerization dynamics of intracellular microtubules. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 104, 16128–16133.
- Breitsprecher, D., R. Jaiswal, J. P. Bombardier, C. J. Gould, J. Gelles, and B. L. Goode (2012). Rocket launcher mechanism of collaborative actin assembly defined by single-molecule imaging. *Science (New York, N.Y.)* 336, 1164–8.

-
- Bretscher, M. S. and C. Aguado-Velasco (1998). Membrane traffic during cell locomotion.
- Britto, M., A. Goulet, S. Rizvi, O. von Loeffelholz, C. A. Moores, and R. A. Cross (2016). Schizosaccharomyces pombe kinesin-5 switches direction using a steric blocking mechanism. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 113, E7483–E7489.
- Broussard, J. A., D. J. Webb, and I. Kaverina (2008). Asymmetric focal adhesion disassembly in motile cells.
- Brown, M. C., J. A. Perrotta, and C. E. Turner (1996). Identification of LIM3 as the principal determinant of paxillin focal adhesion localization and characterization of a novel motif on paxillin directing vinculin and focal adhesion kinase binding. *Journal of Cell Biology* 135, 1109–1123.
- Bulinski, J. C. and G. G. Gundersen (1991). Stabilization of post-translational modification of microtubules during cellular morphogenesis. *BioEssays : news and reviews in molecular, cellular and developmental biology* 13, 285–93.
- Burute, M. and M. Thery (2012). Spatial segregation between cell-cell and cell-matrix adhesions.
- Camand, E., F. Peglion, N. Osmani, M. Sanson, and S. Etienne-Manneville (2012). N-cadherin expression level modulates integrin-mediated polarity and strongly impacts on the speed and directionality of glial cell migration. *Journal of Cell Science* 125, 844–857.
- Cambray-Deakin, M. a. and R. D. Burgoyne (1987a). Acetylated and detyrosinated alpha-tubulins are co-localized in stable microtubules in rat meningeal fibroblasts. *Cell motility and the cytoskeleton* 8, 284–91.
- Cambray-Deakin, M. a. and R. D. Burgoyne (1987b). Acetylated and detyrosinated alpha-tubulins are co-localized in stable microtubules in rat meningeal fibroblasts. *Cell motility and the cytoskeleton* 8, 284–91.

-
- Campbell, P. K., K. G. Waymire, R. L. Heier, C. Sharer, D. E. Day, H. Reimann, J. Michael Jaje, G. A. Friedrich, M. Burmeister, T. J. Bartness, L. D. Russell, L. J. Young, M. Zimmer, D. E. Jenne, and G. R. MacGregor (2002). Mutation of a novel gene results in abnormal development of spermatid flagella, loss of intermale aggression and reduced body fat in mice. *Genetics* 162, 307–320.
- Cassimeris, L. (1993). Regulation of microtubule dynamic instability.
- Cassimeris, L. (2009). Microtubule Assembly : Lattice GTP to the Rescue.
- Cassimeris, L., N. K. Pryer, and E. D. Salmon (1988). Real-time observations of microtubule dynamic instability in living cells. *Journal of Cell Biology* 107, 2223–2231.
- Castro-Castro, A., C. Janke, G. Montagnac, P. Paul-Gilloteaux, and P. Chavrier (2012). ATAT1/MEC-17 acetyltransferase and HDAC6 deacetylase control a balance of acetylation of alpha-tubulin and cortactin and regulate MT1-MMP trafficking and breast tumor cell invasion. *European Journal of Cell Biology* 91, 950–960.
- Caswell, P. and J. Norman (2008, June). Endocytic transport of integrins during cell migration and invasion. *Trends in cell biology* 18(6), 257–63.
- Caswell, P. T., S. Vadrevu, and J. C. Norman (2009a). Integrins : masters and slaves of endocytic transport. *Nature reviews. Molecular cell biology* 10, 843–853.
- Caswell, P. T., S. Vadrevu, and J. C. Norman (2009b). Integrins : masters and slaves of endocytic transport. *Nature reviews. Molecular cell biology* 10(DECeMBER), 843–853.
- Chan, K. T., D. A. Bennin, and A. Huttenlocher (2010). Regulation of adhesion dynamics by calpain-mediated proteolysis of focal adhesion kinase (FAK). *Journal of Biological Chemistry* 285, 11418–11426.
- Chang, Y.-C., P. Nalbant, J. Birkenfeld, Z.-F. Chang, and G. M. Bokoch (2007). GEF-H1 Couples Nocodazole-induced Microtubule Disassembly to Cell Contractility via RhoA. *Molecular biology of the cell* 19, 308–317.

-
- Choi, C. K., M. Vicente-Manzanares, J. Zareno, L. A. Whitmore, A. Mogilner, and A. R. Horwitz (2008). Actin and alpha-actinin orchestrate the assembly and maturation of nascent adhesions in a myosin II motor-independent manner. *Nature cell biology* 10, 1039–50.
- Choudhary, C., C. Kumar, F. Gnad, M. L. Nielsen, M. Rehman, T. C. Walther, J. V. Olsen, and M. Mann (2009). Lysine acetylation targets protein complexes and co-regulates major cellular functions. *Science (New York, N.Y.)* 325, 834–40.
- Christiansen, J. J. and A. K. Rajasekaran (2006). Reassessing epithelial to mesenchymal transition as a prerequisite for carcinoma invasion and metastasis.
- Christopherson, K. S., E. M. Ullian, C. C. A. Stokes, C. E. Mullowney, J. W. Hell, A. Agah, J. Lawler, D. F. Mosher, P. Bornstein, and B. A. Barres (2005). Thrombospondins are astrocyte-secreted proteins that promote CNS synaptogenesis. *Cell* 120, 421–433.
- Chu, C.-W., F. Hou, J. Zhang, L. Phu, A. V. Loktev, D. S. Kirkpatrick, P. K. Jackson, Y. Zhao, and H. Zou (2011). A novel acetylation of β -tubulin by San modulates microtubule polymerization via down-regulating tubulin incorporation. *Molecular biology of the cell* 22, 448–456.
- Chu, D. T. W. and M. W. Klymkowsky (1989). The appearance of acetylated β -tubulin during early development and cellular differentiation in *Xenopus*. *Developmental Biology* 136, 104–117.
- Chung, B. M., J. D. Rotty, and P. A. Coulombe (2013). Networking galore : Intermediate filaments and cell migration.
- Cleveland, D. W., M. W. Kirschner, and N. J. Cowan (1978). Isolation of separate mRNAs for β - and α -Tubulin and characterization of the corresponding in vitro translation products. *Cell* 15(November), 1021–1031.
- Coombes, C., A. Yamamoto, M. McClellan, T. A. Reid, M. Plooster, G. W. G. Luxton, J. Alper, J. Howard, and M. K. Gardner (2016).

-
- Mechanism of microtubule lumen entry for the α -tubulin acetyltransferase enzyme α TAT1. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 113, E7176–E7184.
- Cox, D., M. Brennan, and N. Moran (2010). Integrins as therapeutic targets : lessons and opportunities. *Nature reviews. Drug discovery* 9, 804–820.
- Coyer, S. R., A. Singh, D. W. Dumbauld, D. a. Calderwood, S. W. Craig, E. Delamarche, and a. J. Garcia (2012). Nanopatterning Reveals an ECM Area Threshold for Focal Adhesion Assembly and Force Transmission that is regulated by Integrin Activation and Cytoskeleton Tension. *Journal of Cell Science* 125, 5110–23.
- Critchley, D. R., D. R. Critchley, A. R. Gingras, and A. R. Gingras (2008). Talin at a glance. *Journal of Cell Science* 121, 1345–1347.
- Crowley, E. and A. F. Horwitz (1995). Tyrosine phosphorylation and cytoskeletal tension regulate the release of fibroblast adhesions. *Journal of Cell Biology* 131, 525–537.
- Cueva, J. G., J. Hsin, K. C. Huang, and M. B. Goodman (2012). Posttranslational acetylation of α -tubulin constrains protofilament number in native microtubules. *Current Biology* 22, 1066–1074.
- Dabiri, B. E., H. Lee, and K. K. Parker (2012). A potential role for integrin signaling in mechanoelectrical feedback.
- Dammermann, A., A. Desai, and K. Oegema (2003). The minus end in sight.
- Dasgupta, D., R. Rajgopalan, and S. Gurnani (1983). Involvement of colchicine binding site of tubulin in the polymerisation process. *FEBS Letters* 152, 101–104.
- De Groot, C. O., I. Jelesarov, F. F. Damberger, S. Bjelić, M. A. Schäerer, N. S. Bhavesh, I. Grigoriev, R. M. Buey, K. Wüthrich, G. Capitani, A. Akhmanova, and M. O. Steinmetz (2010). Molecular insights into mammalian end-binding protein heterodimerization. *Journal of Biological Chemistry* 285, 5802–5814.
- Deakin, N. O. and C. E. Turner (2008). Paxillin comes of age. *Journal of cell science* 121, 2435–44.

-
- Deanin, G. G. and M. W. Gordon (1976). The distribution of tyrosyltubulin ligase in brain and other tissues. *Biochemical and Biophysical Research Communications* 71, 676–683.
- del Rio, A., R. Perez-Jimenez, R. Liu, P. Roca-Cusachs, J. M. Fernandez, and M. P. Sheetz (2009). Stretching single talin rod molecules activates vinculin binding. *Science (New York, N.Y.)* 323, 638–41.
- Denoulet, P., B. Edde, and F. Gros (1986). Differential Expression of Several Neurospecific Beta-Tubulin Messenger-Rnas in the Mouse-Brain during Development. *Gene* 50, 289–297.
- Desai, A. and T. J. Mitchison (1997). Microtubule polymerization dynamics. *Annual review of cell and developmental biology* 13, 83–117.
- Dimitrov, A., M. Quesnoit, S. Moutel, I. Cantaloube, C. Poüs, and F. Perez (2008). Detection of GTP-tubulin conformation in vivo reveals a role for GTP remnants in microtubule rescues. *Science (New York, N.Y.)* 322, 1353–1356.
- Ding, H., P. J. Dolan, and G. V. W. Johnson (2008). Histone deacetylase 6 interacts with the microtubule-associated protein tau. *Journal of Neurochemistry* 106, 2119–2130.
- Discher, D. E., P. Janmey, and Y.-L. Wang (2005). Tissue cells feel and respond to the stiffness of their substrate. *Science (New York, N.Y.)* 310, 1139–43.
- Dixit, R., B. Barnett, J. E. Lazarus, M. Tokito, Y. E. Goldman, and E. L. F. Holzbaur (2009). Microtubule plus-end tracking by CLIP-170 requires EB1. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 106, 492–497.
- Dogterom, M. and B. Yurke (1997). Measurement of the force-velocity relation for growing microtubules. *Science (New York, N.Y.)* 278, 856–860.
- Dompierre, J. P., J. D. Godin, B. C. Charrin, F. P. Cordelières, S. J. King, S. Humbert, and F. Saudou (2007). Histone deacetylase 6 inhibition compensates for the transport deficit in Huntington’s disease

by increasing tubulin acetylation. *The Journal of neuroscience : the official journal of the Society for Neuroscience* 27(13), 3571–3583.

Dráber, P., E. Dráberová, I. Linhartová, V. Viklický, P. Draber, E. Dráberová, I. Linhartová, and V. Viklický (1989). Differences in the exposure of C- and N-terminal tubulin domains in cytoplasmic microtubules detected with domain-specific monoclonal antibodies. *Journal of Cell Science* 92, 519–528.

Dráberová, E., V. Viklický, and P. Dráber (2000). Exposure of luminal microtubule sites after mild fixation. *European journal of cell biology* 79, 982–985.

Driskell, O. J., A. Mironov, V. J. Allan, and P. G. Woodman (2007). Dynein is required for receptor sorting and the morphogenesis of early endosomes. *Nature cell biology* 9, 113–120.

Dupin, I., E. Camand, and S. Etienne-Manneville (2009). Classical cadherins control nucleus and centrosome position and cell polarity. *Journal of Cell Biology* 185, 779–786.

Dupin, I., Y. Sakamoto, and S. Etienne-Manneville (2011). Cytoplasmic intermediate filaments mediate actin-driven positioning of the nucleus. *Journal of cell science* 124, 865–72.

Efimov, A., N. Schiefermeier, I. Grigoriev, R. Ohi, M. C. Brown, C. E. Turner, J. V. Small, and I. Kaverina (2008). Paxillin-dependent stimulation of microtubule catastrophes at focal adhesion sites. *Journal of cell science* 121, 196–204.

Elric, J. and S. Etienne-Manneville (2014). Centrosome positioning in polarized cells : Common themes and variations.

Engler, A. J., S. Sen, H. L. Sweeney, and D. E. Discher (2006). Matrix Elasticity Directs Stem Cell Lineage Specification. *Cell* 126, 677–689.

Erck, C., L. Peris, A. Andrieux, C. Meissirel, A. D. Gruber, M. Vernet, A. Schweitzer, Y. Saoudi, H. Pointu, C. Bosc, P. a. Salin, D. Job, and J. Wehland (2005). A vital role of tubulin-tyrosine-ligase for neuronal organization. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 102, 7853–7858.

-
- Esue, O., A. A. Carson, Y. Tseng, and D. Wirtz (2006). A direct interaction between actin and vimentin filaments mediated by the tail domain of vimentin. *Journal of Biological Chemistry* 281, 30393–30399.
- Etienne-Manneville, S. (2004a). Actin and microtubules in cell motility : Which one is in control ?
- Etienne-Manneville, S. (2004b). Actin and microtubules in cell motility : Which one is in control ? *Traffic* 5(5), 470–477.
- Etienne-Manneville, S. (2004c). Cdc42—the centre of polarity. *Journal of cell science* 117, 1291–1300.
- Etienne-Manneville, S. (2006, January). In vitro assay of primary astrocyte migration as a tool to study Rho GTPase function in cell polarization. *Methods in enzymology* 406(1995), 565–78.
- Etienne-Manneville, S. (2009). APC in cell migration. *Advances in experimental medicine and biology* 656, 30–40.
- Etienne-Manneville, S. (2010). From signaling pathways to microtubule dynamics : the key players.
- Etienne-Manneville, S. (2011). Control of polarized cell morphology and motility by adherens junctions.
- Etienne-Manneville, S. (2012). Adherens junctions during cell migration. *Sub-cellular biochemistry* 60, 225–49.
- Etienne-Manneville, S. (2013a). Microtubules in cell migration. *Annual review of cell and developmental biology* 29, 471–99.
- Etienne-Manneville, S. (2013b). Microtubules in cell migration. *Annual review of cell and developmental biology* 29, 471–99.
- Etienne-Manneville, S. and A. Hall (2001). Integrin-mediated activation of Cdc42 controls cell polarity in migrating astrocytes through PKC ζ . *Cell* 106, 489–498.
- Etienne-Manneville, S. and A. Hall (2002a). Cell polarity : Par6, aPKC and cytoskeletal crosstalk.

-
- Etienne-Manneville, S. and A. Hall (2002b). Rho GTPases in cell biology. *Nature* 420, 629–635.
- Etienne-Manneville, S. and A. Hall (2003). Cdc42 regulates GSK-3 β and adenomatous polyposis coli to control cell polarity. *Nature* 421, 753–756.
- Etienne-Manneville, S., J. B. Manneville, S. Nicholls, M. A. Ferenczi, and A. Hall (2005). Cdc42 and Par6-PKC δ regulate the spatially localized association of Dlg1 and APC to control cell polarization. *Journal of Cell Biology* 170, 895–901.
- Euteneuer, U. and M. Schliwa. Persistent, directional motility of cells and cytoplasmic fragments in the absence of microtubules. *Nature* 310, 58–61.
- Ewald, A. J., A. Brenot, M. Duong, B. S. Chan, and Z. Werb (2008). Collective Epithelial Migration and Cell Rearrangements Drive Mammary Branching Morphogenesis. *Developmental Cell* 14, 570–581.
- Ezratty, E. J., C. Bertaux, E. E. Marcantonio, and G. G. Gundersen (2009). Clathrin mediates integrin endocytosis for focal adhesion disassembly in migrating cells. *Journal of Cell Biology* 187, 733–747.
- Ezratty, E. J., M. A. Partridge, and G. G. Gundersen (2005). Microtubule-induced focal adhesion disassembly is mediated by dynamin and focal adhesion kinase. *Nature cell biology* 7, 581–590.
- Flotho, A. and F. Melchior (2013). Sumoylation : A Regulatory Protein Modification in Health and Disease. <http://dx.doi.org/10.1146/annurev-biochem-061909-093311>.
- Franco, S. J. and A. Huttenlocher (2005). Regulating cell migration : calpains make the cut. *Journal of cell science* 118, 3829–38.
- Franco, S. J., M. a. Rodgers, B. J. Perrin, J. Han, D. a. Bennin, D. R. Critchley, and A. Huttenlocher (2004). Calpain-mediated proteolysis of talin regulates adhesion dynamics. *Nature cell biology* 6, 977–983.
- Friedl, P., E. B. Bröcker, and K. S. Zänker (1998). Integrins, cell matrix interactions and cell migration strategies : fundamental differences in leukocytes and tumor cells. *Cell adhesion and communication* 6, 225–36.

-
- Friedl, P. and D. Gilmour (2009). Collective cell migration in morphogenesis, regeneration and cancer. *Nature reviews. Molecular cell biology* 10(july), 445–457.
- Friedl, P. and K. Wolf (2010). Plasticity of cell migration : A multiscale tuning model.
- Friedl, P., K. S. Zanker, P. Friedl, P. B. Noble, K. S. Zanker, P. A. Walton, D. W. Laird, P. J. Chauvin, R. J. Tabah, and M. Black (1995). Migration of Coordinated Cell Clusters in Mesenchymal and Epithelial Cancer Explants in Vitro. *Cancer Research* 55, 4557–4560.
- Fuchs, E. and S. Raghavan (2002). GETTING UNDER THE SKIN OF EPIDERMAL MORPHOGENESIS. *Nature Reviews Genetics* 3, 199–209.
- Fukata, Y. and M. Fukata (2010). Protein palmitoylation in neuronal development and synaptic plasticity. *Nat Rev Neurosci* 11, 161–175.
- Galjart, N. (2005). CLIPs and CLASPs and cellular dynamics. *Nat. Rev. Mol. Cell Biol.* 6, 487–498.
- Gan, Z., L. Ding, C. J. Burckhardt, J. Lowery, A. Zaritsky, K. Sitterley, A. Mota, N. Costigliola, C. G. Starker, D. F. Voytas, J. Tytell, R. D. Goldman, and G. Danuser (2016). Vimentin Intermediate Filaments Template Microtubule Networks to Enhance Persistence in Cell Polarity and Directed Migration. *Cell Systems* 3, 252–263.e8.
- Gard, D. L. and M. W. Kirschner (1985). A polymer-dependent increase in phosphorylation of beta-tubulin accompanies differentiation of a mouse neuroblastoma cell line. *The Journal of cell biology* 100, 764–774.
- Gardel, M. L., B. Sabass, L. Ji, G. Danuser, U. S. Schwarz, and C. M. Waterman (2008). Traction stress in focal adhesions correlates biphasically with actin retrograde flow speed. *Journal of Cell Biology* 183, 999–1005.
- Gardel, M. L., I. C. Schneider, Y. Aratyn-Schaus, and C. M. Waterman (2010). Mechanical integration of actin and adhesion dynamics in cell migration. *Annual review of cell and developmental biology* 26, 315–333.

-
- Garnier, C., P. Barbier, R. Gilli, C. Lopez, V. Peyrot, and C. Briand (1998). Heat-shock protein 90 (hsp90) binds in vitro to tubulin dimer and inhibits microtubule formation. *Biochemical and biophysical research communications* 250, 414–9.
- Geiger, B., J. P. Spatz, and A. D. Bershadsky (2009). Environmental sensing through focal adhesions. *Nature reviews. Molecular cell biology* 10, 21–33.
- Giannone, G., G. Jiang, D. H. Sutton, D. R. Critchley, and M. P. Sheetz (2003). Talin1 is critical for force-dependent reinforcement of initial integrin-cytoskeleton bonds but not tyrosine kinase activation. *Journal of Cell Biology* 163, 409–419.
- Giannone, G., R. M. M??ge, and O. Thoumine (2009). Multi-level molecular clutches in motile cell processes.
- Gierke, S. and T. Wittmann (2012). EB1-recruited microtubule +TIP complexes coordinate protrusion dynamics during 3D epithelial remodeling. *Current Biology* 22, 753–762.
- Gireesh, K. K., J. S. Sreeja, S. Chakraborti, P. Singh, G. E. Thomas, H. Gupta, and T. Manna (2014). Microtubule +TIP protein EB1 binds to GTP and undergoes dissociation from dimer to monomer on binding GTP. *Biochemistry* 53, 5551–5557.
- Godsel, L. M., R. P. Hobbs, and K. J. Green (2008). Intermediate filament assembly : dynamics to disease.
- Gomes, E. R., S. Jani, and G. G. Gundersen (2005a). Nuclear movement regulated by Cdc42, MRCK, myosin, and actin flow establishes MTOC polarization in migrating cells. *Cell* 121, 451–463.
- Gomes, E. R., S. Jani, and G. G. Gundersen (2005b). Nuclear movement regulated by Cdc42, MRCK, myosin, and actin flow establishes MTOC polarization in migrating cells. *Cell* 121, 451–463.
- Gotlieb, A. I., L. M. May, L. Subrahmanyam, and V. I. Kalnins (1981). Distribution of microtubule organizing centers in migrating sheets of endothelial cells. *Journal of Cell Biology* 91, 589–594.

-
- Grigoriev, I., D. Splinter, N. Keijzer, P. S. Wulf, J. Demmers, T. Ohtsuka, M. Modesti, I. V. Maly, F. Grosveld, C. C. Hoogenraad, and A. Akhmanova (2007). Rab6 Regulates Transport and Targeting of Exocytotic Carriers. *Developmental Cell* 13, 305–314.
- Grigoriev, I., K. L. Yu, E. Martinez-Sanchez, A. Serra-Marques, I. Smal, E. Meijering, J. Demmers, J. Peränen, R. J. Pasterkamp, P. Van Der Sluijs, C. C. Hoogenraad, and A. Akhmanova (2011). Rab6, Rab8, and MICAL3 cooperate in controlling docking and fusion of exocytotic carriers. *Current Biology* 21, 967–974.
- Grimaldi, A. D., T. Maki, B. P. Fitton, D. Roth, D. Yampolsky, M. W. Davidson, T. Svitkina, A. Straube, I. Hayashi, and I. Kaverina (2014). CLASPs are required for proper microtubule localization of end-binding proteins. *Developmental Cell* 30, 343–352.
- Gu, Z., E. H. Noss, V. W. Hsu, and M. B. Brenner (2011). Integrins traffic rapidly via circular dorsal ruffles and macropinocytosis during stimulated cell migration. *Journal of Cell Biology* 193, 61–70.
- Gundersen, G. G. and J. C. Bulinski (1988). Selective stabilization of microtubules oriented toward the direction of cell migration. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 85, 5946–50.
- Gundersen, G. G., S. Khawaja, and J. C. Bulinski (1987). Postpolymerization detyrosination of alpha-tubulin : a mechanism for subcellular differentiation of microtubules. *Journal of Cell Biology* 105(July), 251–264.
- Guo, W., F. Tamanoi, and P. Novick (2001). Spatial regulation of the exocyst complex by Rho1 GTPase. *Nature cell biology* 3, 353–360.
- Gupton, S. L. and F. B. Gertler (2010). Integrin signaling switches the cytoskeletal and exocytic machinery that drives neuriteogenesis. *Developmental Cell* 18, 725–736.
- Gupton, S. L. and C. M. Waterman-Storer (2006). Spatiotemporal Feedback between Actomyosin and Focal-Adhesion Systems Optimizes Rapid Cell Migration. *Cell* 125, 1361–1374.

-
- Haas, P. and D. Gilmour (2006). Chemokine Signaling Mediates Self-Organizing Tissue Migration in the Zebrafish Lateral Line. *Developmental Cell* 10, 673–680.
- Haggarty, S. J., K. M. Koeller, J. C. Wong, C. M. Grozinger, and S. L. Schreiber (2003). Domain-selective small-molecule inhibitor of histone deacetylase 6 (HDAC6)-mediated tubulin deacetylation. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 100, 4389–94.
- Hall, a. (2005). Rho GTPases and the control of cell behaviour. *Biochemical Society transactions* 33, 891–895.
- Hallak, M. E., J. A. Rodriguez, H. S. Barra, and R. Caputto (1977). Release of tyrosine from tyrosinated tubulin. Some common factors that affect this process and the assembly of tubulin. *FEBS Letters* 73, 147–150.
- Hammond, J. W., C.-F. Huang, S. Kaech, C. Jacobson, G. Banker, and K. J. Verhey (2010). Posttranslational modifications of tubulin and the polarized transport of kinesin-1 in neurons. *Molecular biology of the cell* 21, 572–583.
- Harris, A., J. I. Morgan, M. Pecot, A. Soumare, A. Osborne, and H. D. Soares (2000). Regenerating motor neurons express Nna1, a novel ATP/GTP-binding protein related to zinc carboxypeptidases. *Molecular and cellular neurosciences* 16, 578–96.
- Hayashi, I. and M. Ikura (2003). Crystal structure of the amino-terminal microtubule-binding domain of end-binding protein 1 (EB1). *Journal of Biological Chemistry* 278, 36430–36434.
- Hersel, U., C. Dahmen, and H. Kessler (2003). RGD modified polymers : Biomaterials for stimulated cell adhesion and beyond.
- Higginbotham, H. R. and J. G. Gleeson (2007). The centrosome in neuronal development.
- Hisanaga, S. and N. Hirokawa (1990). Dephosphorylation-induced interactions of neurofilaments with microtubules. *Journal of Biological Chemistry* 265, 21852–21858.

-
- Holmes, K. C., D. Popp, W. Gebhard, and W. Kabsch (1990). Atomic model of the actin filament.
- Hotta, A., T. Kawakatsu, T. Nakatani, T. Sato, C. Matsui, T. Sukezane, T. Akagi, T. Hamaji, I. Grigoriev, A. Akhmanova, Y. Takai, and Y. Mimori-Kiyosue (2010). Laminin-based cell adhesion anchors microtubule plus ends to the epithelial cell basal cortex through LL5??/?? *Journal of Cell Biology* 189, 901–907.
- Howard, J. and A. A. Hyman (2007). Microtubule polymerases and depolymerases.
- Howes, S. C., G. M. Alushin, T. Shida, M. V. Nachury, and E. Nogales (2014). Effects of tubulin acetylation and tubulin acetyltransferase binding on microtubule structure. *Molecular biology of the cell* 25, 257–66.
- Hubbert, C., A. Guardiola, R. Shao, Y. Kawaguchi, A. Ito, A. Nixon, M. Yoshida, X.-F. Wang, and T.-P. Yao (2002). HDAC6 is a microtubule-associated deacetylase. *Nature* 417, 455–458.
- Huber, F., A. Boire, M. P. López, and G. H. Koenderink (2015). Cytoskeletal crosstalk : When three different personalities team up.
- Huveneers, S., S. Arslan, B. Van De Water, A. Sonnenberg, and E. H. J. Danen (2008). Integrins uncouple Src-induced morphological and oncogenic transformation. *Journal of Biological Chemistry* 283, 13243–13251.
- Huveneers, S. and E. H. J. Danen (2009). Adhesion signaling - crosstalk between integrins, Src and Rho. *Journal of cell science* 122, 1059–1069.
- Ikegami, K., R. L. Heier, M. Taruishi, H. Takagi, M. Mukai, S. Shimma, S. Taira, K. Hatanaka, N. Morone, I. Yao, P. K. Campbell, S. Yuasa, C. Janke, G. R. Macgregor, and M. Setou (2007). Loss of alpha-tubulin polyglutamylation in ROSA22 mice is associated with abnormal targeting of KIF1A and modulated synaptic function. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 104(9), 3213–3218.

-
- Janke, C. (2014). The tubulin code : Molecular components, readout mechanisms, functions. *Journal of Cell Biology* 206(4), 461–472.
- Janke, C. and J. Chloë Bulinski (2011). Post-translational regulation of the microtubule cytoskeleton : mechanisms and functions. *Nature Reviews Molecular Cell Biology* 12(November), 773–786.
- Janke, C. and M. Kneussel (2010). Tubulin post-translational modifications : Encoding functions on the neuronal microtubule cytoskeleton.
- Janke, C., K. Rogowski, and J. van Dijk (2008). Polyglutamylolation : a fine-regulator of protein function ? 'Protein Modifications : beyond the usual suspects' review series. *EMBO reports* 9(7), 636–641.
- Jiang, G., G. Giannone, D. R. Critchley, E. Fukumoto, and M. P. Sheetz (2003). Two-piconewton slip bond between fibronectin and the cytoskeleton depends on talin. *Nature* 424, 334–337.
- Jiang, K., S. Hua, R. Mohan, I. Grigoriev, K. Yau, Q. Liu, E. A. Katrukha, A. F. M. Altelaar, A. J. R. Heck, C. C. Hoogenraad, and A. Akhmanova (2014). Microtubule Minus-End Stabilization by Polymerization-Driven CAMSAP Deposition. *Developmental Cell* 28, 295–309.
- Kainulainen, T., A. Pender, M. D'Addario, Y. Feng, P. Lekic, and C. A. McCulloch (2002). Cell death and mechanoprotection by filamin A in connective tissues after challenge by applied tensile forces. *Journal of Biological Chemistry* 277, 21998–22009.
- Kalebic, N., C. Martinez, E. Perlas, P. Hublitz, D. Bilbao-Cortes, K. Fiedorczuk, A. Andolfo, and P. A. Heppenstall (2013). Tubulin acetyltransferase α TAT1 destabilizes microtubules independently of its acetylation activity. *Molecular and cellular biology* 33, 1114–23.
- Kalinina, E., R. Biswas, I. Berezniuk, A. Hermoso, F. X. Aviles, and L. D. Fricker (2007). A novel subfamily of mouse cytosolic carboxypeptidases. *The FASEB journal : official publication of the Federation of American Societies for Experimental Biology* 21, 836–850.
- Kanchanawong, P., G. Shtengel, A. M. Pasapera, E. B. Ramko, M. W. Davidson, H. F. Hess, and C. M. Waterman (2010). Nanoscale architecture of integrin-based cell adhesions. *Nature* 468, 580–4.

-
- Kaul, N., V. Soppina, and K. J. Verhey (2014). Effects of α -tubulin K40 acetylation and detyrosination on kinesin-1 motility in a purified system. *Biophysical Journal* 106(12), 2636–2643.
- Kaverina, I., O. Krylyshkina, and J. V. Small (1999). Microtubule targeting of substrate contacts promotes their relaxation and dissociation. *Journal of Cell Biology* 146, 1033–1043.
- Kaverina, I., K. Rottner, and J. V. Small (1998). Targeting, capture, and stabilization of microtubules at early focal adhesions. *Journal of Cell Biology* 142, 181–190.
- Kawasaki, Y. (2000). Asef, a Link Between the Tumor Suppressor APC and G-Protein Signaling. *Science* 289, 1194–1197.
- Keren, K., Z. Pincus, G. M. Allen, E. L. Barnhart, G. Marriott, A. Mogilner, and J. a. Theriot (2008). Mechanism of shape determination in motile cells. *Nature* 453, 475–480.
- Kierszenbaum, A. L. (2002). Sperm axoneme : A tale of tubulin post-translation diversity. *Molecular Reproduction and Development* 62, 1–3.
- Kimura, Y., N. Kurabe, K. Ikegami, K. Tsutsumi, Y. Konishi, O. I. Kaplan, H. Kunitomo, Y. Iino, O. E. Blacque, and M. Setou (2010). Identification of tubulin deglutamylase among *Caenorhabditis elegans* and mammalian cytosolic carboxypeptidases (CCPs). *Journal of Biological Chemistry* 285, 22936–22941.
- Kirschner, M. and T. Mitchison (1986). Beyond self-assembly : From microtubules to morphogenesis.
- Kirschner, M. W. and T. Mitchison. Microtubule dynamics. *Nature* 324, 621.
- Klemke, R. L., S. Cai, A. L. Giannini, P. J. Gallagher, P. de Lanerolle, and D. A. Cheresh (1997). Regulation of cell motility by mitogen-activated protein kinase. *Journal of Cell Biology* 137, 481–492.
- Kölsch, V., P. G. Charest, and R. a. Firtel (2008). The regulation of cell motility and chemotaxis by phospholipid signaling. *Journal of cell science* 121, 551–9.

-
- Komarova, Y. A., A. S. Akhmanova, S. I. Kojima, N. Galjart, and G. G. Borisy (2002). Cytoplasmic linker proteins promote microtubule rescue in vivo. *Journal of Cell Biology* 159, 589–599.
- Kong, X., X. Wang, S. Misra, and J. Qin (2006). Structural Basis for the Phosphorylation-regulated Focal Adhesion Targeting of Type I?? Phosphatidylinositol Phosphate Kinase (PIPKI??) by Talin. *Journal of Molecular Biology* 359, 47–54.
- Krauh, E., M. Little, T. Kempf, R. Hofer-Warbinek, W. Ade, and H. Ponstingl (1981). Complete amino acid sequence of beta-tubulin from porcine brain. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 78, 4156–60.
- Krendel, M., F. T. Zenke, and G. M. Bokoch (2002). Nucleotide exchange factor GEF-H1 mediates cross-talk between microtubules and the actin cytoskeleton. *Nature cell biology* 4, 294–301.
- Krista A. van Nifterik, Paula H. M. Elkhuisen, Rob J. van Andel, Lukas J. A. Stalpers, Sieger Leenstra, M. Vincent M. Lafleur, W. Peter Vandertop, Ben J. Slotman, Theo J. M. Hulsebos and P. Sminia (2006). Genetic profiling of a distant second glioblastoma multiforme after radiotherapy : recurrence or second primary tumor? *Journal of Neurosurgery* 105(5), 739–744.
- Kroboth, K., I. P. Newton, K. Kita, D. Dikovskaya, J. Zumbrunn, C. M. Waterman-Storer, and I. S. Näthke (2007). Lack of adenomatous polyposis coli protein correlates with a decrease in cell migration and overall changes in microtubule stability. *Molecular biology of the cell* 18, 910–8.
- Krylyshkina, O., K. I. Anderson, I. Kaverina, I. Upmann, D. J. Manstein, J. V. Small, and D. K. Toomre (2003). Nanometer targeting of microtubules to focal adhesions. *Journal of Cell Biology* 161, 853–859.
- Krylyshkina, O., I. Kaverina, W. Kranewitter, W. Steffen, M. C. Alonso, R. A. Cross, and J. V. Small (2002). Modulation of substrate adhesion dynamics via microtubule targeting requires kinesin-1. *Journal of Cell Biology* 156, 349–359.

-
- Kumar, N. and M. Flavin (1981). Preferential action of a brain deetyrosinolytic carboxypeptidase on polymerized tubulin. *Journal of Biological Chemistry* 256, 7678–7686.
- Kupfer, a., D. Louvard, and S. J. Singer (1982). Polarization of the Golgi apparatus and the microtubule-organizing center in cultured fibroblasts at the edge of an experimental wound. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 79, 2603–2607.
- Lacroix, B., J. Van Dijk, N. D. Gold, J. Guizetti, G. Aldrian-Herrada, K. Rogowski, D. W. Gerlich, and C. Janke (2010). Tubulin polyglutamylation stimulates spastin-mediated microtubule severing. *Journal of Cell Biology* 189, 945–954.
- Ladoux, B., E. Anon, M. Lambert, A. Rabodzey, P. Hersen, A. Buguin, P. Silberzan, and R. M. Mège (2010). Strength dependence of cadherin-mediated adhesions. *Biophysical Journal* 98, 534–542.
- Ladoux, B. and A. Nicolas (2012). Physically based principles of cell adhesion mechanosensitivity in tissues. *Reports on Progress in Physics* 75, 116601.
- Laird, a. D., G. Li, K. G. Moss, R. a. Blake, M. a. Broome, J. M. Cherrington, and D. B. Mendel (2003). Src family kinase activity is required for signal transducer and activator of transcription 3 and focal adhesion kinase phosphorylation and vascular endothelial growth factor signaling in vivo and for anchorage-dependent and -independent growth of human tu. *Molecular cancer therapeutics* 2, 461–469.
- Laukaitis, C. M., D. J. Webb, K. Donais, and A. F. Horwitz (2001). Differential dynamics of $\alpha 5$ integrin, paxillin, and α -actinin during formation and disassembly of adhesions in migrating cells. *Journal of Cell Biology* 153, 1427–1440.
- Lawson, C., S. T. Lim, S. Uryu, X. L. Chen, D. A. Calderwood, and D. D. Schlaepfer (2012). FAK promotes recruitment of talin to nascent adhesions to control cell motility. *Journal of Cell Biology* 196, 223–232.

-
- Lawson, C. D. and K. Burridge (2014). The on-off relationship of Rho and Rac during integrin-mediated adhesion and cell migration. *Small GTPases* 5, e27958.
- Le Clainche, C., M.-f. F. Carlier, and C. L. E. Clainche (2008). Regulation of actin assembly associated with protrusion and adhesion in cell migration. *Physiol Rev* 88, 489–513.
- Lecaudey, V., G. Cakan-Akdogan, W. H. J. Norton, and D. Gilmour (2008). Dynamic Fgf signaling couples morphogenesis and migration in the zebrafish lateral line primordium. *Development (Cambridge, England)* 135, 2695–2705.
- Ledbetter, M. C. and K. R. Porter (1964). Morphology of Microtubules of Plant Cell. *Science (New York, N.Y.)* 144, 872–4.
- Leduc, C. and S. Etienne-Manneville (2015). Intermediate filaments in cell migration and invasion : The unusual suspects.
- Lee, S. W., B. a. Fraass, L. H. Marsh, K. Herbort, S. S. Gebarski, M. K. Martel, E. H. Radany, A. S. Lichter, and H. M. Sandler (1999). Patterns of failure following high-dose 3-D conformal radiotherapy for high-grade astrocytomas : A quantitative dosimetric study. *International Journal of Radiation Oncology Biology Physics* 43(1), 79–88.
- Lewis, S. a., W. Gu, and N. J. Cowan (1987). Free Intermingling of Mammalian Beta-Tubulin Isoforms among Functionally Distinct Microtubules. *Cell* 49, 539–548.
- L'Hernault, S. W. and J. L. Rosenbaum (1983). Chlamydomonas α -tubulin is posttranslationally modified in the flagella during flagellar assembly. *Journal of Cell Biology* 97, 258–263.
- L'Hernault, S. W. and J. L. Rosenbaum (1985). Chlamydomonas α -tubulin is posttranslationally modified by acetylation on the epsilon-amino group of a lysine. *Biochemistry* 24, 473–478.
- Li, L., D. Wei, Q. Wang, J. Pan, R. Liu, X. Zhang, and L. Bao (2012a). MEC-17 Deficiency Leads to Reduced α -Tubulin Acetylation and Impaired Migration of Cortical Neurons. *Journal of Neuroscience* 32, 12673–12683.

-
- Li, L., D. Wei, Q. Wang, J. Pan, R. Liu, X. Zhang, and L. Bao (2012b). MEC-17 deficiency leads to reduced alpha-tubulin acetylation and impaired migration of cortical neurons. *J Neurosci* 32, 12673–12683.
- Li, R. and G. G. Gundersen (2008). Beyond polymer polarity : how the cytoskeleton builds a polarized cell. *Nature Reviews. Molecular Cell Biology* 9, 860–73.
- Liao, G. and G. G. Gundersen (1998). Kinesin is a candidate for cross-bridging microtubules and intermediate filaments : Selective binding of kinesin to detyrosinated tubulin and vimentin. *Journal of Biological Chemistry* 273, 9797–9803.
- Ling, K., R. L. Doughman, A. J. Firestone, M. W. Bunce, and R. a. Anderson (2002). Type I gamma phosphatidylinositol phosphate kinase targets and regulates focal adhesions. *Nature* 420, 89–93.
- Lomakin, A. J., I. Semenova, I. Zaliapin, P. Kraikivski, E. Nadezhdina, B. M. Slepchenko, A. Akhmanova, and V. Rodionov (2009). CLIP-170-Dependent Capture of Membrane Organelles by Microtubules Initiates Minus-End Directed Transport. *Developmental Cell* 17, 323–333.
- Lu, C., M. Srayko, and P. E. Mains (2004). The *Caenorhabditis elegans* microtubule-severing complex MEI-1/MEI-2 katanin interacts differently with two superficially redundant beta-tubulin isotypes. *Molecular biology of the cell* 15, 142–150.
- Ludueña, R. F. (1998). Multiple forms of tubulin : different gene products and covalent modifications. *International review of cytology* 178, 207–275.
- Ludueña, R. F. and A. Banerjee (2008). The Isotypes of Tubulin. In *The Role of Microtubules in Cell Biology, Neurobiology, and Oncology*, pp. 123–175.
- Luxton, G. W. G., E. R. Gomes, E. S. Folker, E. Vintinner, and G. G. Gundersen (2010). Linear arrays of nuclear envelope proteins harness retrograde actin flow for nuclear movement. *Science (New York, N.Y.)* 329, 956–9.

-
- Luxton, G. W. G. and G. G. Gundersen (2011). Orientation and function of the nuclear-centrosomal axis during cell migration.
- Ly, N., N. Elkhatib, E. Bresteau, O. Piétrement, M. Khaled, M. M. Magiera, C. Janke, E. Le Cam, A. D. Rutenberg, and G. Montagnac (2016). α TAT1 controls longitudinal spreading of acetylation marks from open microtubules extremities. *Scientific Reports* 6, 1–10.
- Maas, C., D. Belgardt, H. K. Lee, F. F. Heisler, C. Lappe-Siefke, M. M. Magiera, J. van Dijk, T. J. Hausrat, C. Janke, and M. Kneussel (2009). Synaptic activation modifies microtubules underlying transport of postsynaptic cargo. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 106, 8731–6.
- Magiera, M. M. and C. Janke (2013). Investigating tubulin post-translational modifications with specific antibodies. *Methods in Cell Biology* 115, 247–267.
- Mallik, R. and S. P. Gross (2004). Molecular motors : Strategies to get along.
- Manneville, J. B., M. Jehanno, and S. Etienne-Manneville (2010). Dlg1 binds GKAP to control dynein association with microtubules, centrosome positioning, and cell polarity. *Journal of Cell Biology* 191, 585–598.
- Marcos, S., J. Moreau, S. Backer, D. Job, A. Andrieux, and E. Bloch-Gallego (2009). Tubulin tyrosination is required for the proper organization and pathfinding of the growth cone. *PLoS ONE* 4.
- Margadant, C., H. N. Monsuur, J. C. Norman, and A. Sonnenberg (2011, October). Mechanisms of integrin activation and trafficking. *Current opinion in cell biology* 23(5), 607–14.
- Martel, V., C. Racaud-Sultan, S. Dupe, C. Marie, F. Paulhe, A. Galmiche, M. R. Block, and C. Albiges-Rizo (2001). Conformation, Localization, and Integrin Binding of Talin Depend on Its Interaction with Phosphoinositides. *Journal of Biological Chemistry* 276, 21217–21227.

-
- Maruta, H., K. Greer, and J. L. Rosenbaum (1986a). The acetylation of alpha-tubulin and its relationship to the assembly and disassembly of microtubules. *Journal of Cell Biology* 103, 571–579.
- Maruta, H., K. Greer, and J. L. Rosenbaum (1986b). The acetylation of alpha-tubulin and its relationship to the assembly and disassembly of microtubules. *Journal of Cell Biology* 103(August), 571–579.
- Maruthamuthu, V., Y. Aratyn-Schaus, and M. L. Gardel (2010). Conserved F-actin dynamics and force transmission at cell adhesions.
- Matanis, T., A. Akhmanova, P. Wulf, E. Del Nery, T. Weide, T. Stepanova, N. Galjart, F. Grosveld, B. Goud, C. I. De Zeeuw, A. Barnekow, and C. C. Hoogenraad (2002). Bicaudal-D regulates COPI-independent Golgi-ER transport by recruiting the dynein-dynactin motor complex. *Nature cell biology* 4, 986–92.
- Matsumoto, S., K. Fumoto, T. Okamoto, K. Kaibuchi, and A. Kikuchi (2010). Binding of APC and dishevelled mediates Wnt5a-regulated focal adhesion dynamics in migrating cells. *The EMBO journal* 29, 1192–204.
- Matsuyama, A., T. Shimazu, Y. Sumida, A. Saito, Y. Yoshimatsu, D. Seigneurin-Berny, H. Osada, Y. Komatsu, N. Nishino, S. Khochbin, S. Horinouchi, and M. Yoshida (2002). In vivo destabilization of dynamic microtubules by HDAC6-mediated deacetylation. *EMBO Journal* 21(24), 6820–6831.
- Mayor, R. and S. Etienne-Manneville (2016). The front and rear of collective cell migration. *Nature Reviews Molecular Cell Biology* 17(2), 97–109.
- McNally, F. J. (1996). Modulation of microtubule dynamics during the cell cycle.
- Mierke, C. T., P. Kollmannsberger, D. P. Zitterbart, J. Smith, B. Fabry, and W. H. Goldmann (2008). Mechano-coupling and regulation of contractility by the vinculin tail domain. *Biophysical Journal* 94, 661–670.

-
- Miller, P. M., A. W. Folkmann, A. R. R. Maia, N. Efimova, A. Efimov, and I. Kaverina (2009). Golgi-derived CLASP-dependent microtubules control Golgi organization and polarized trafficking in motile cells. *Nature cell biology* 11, 1069–80.
- Million, K., J. Larcher, J. Laoukili, D. Bourguignon, F. Marano, and F. Tournier (1999). Polyglutamylation and polyglycylation of alpha- and beta-tubulins during in vitro ciliated cell differentiation of human respiratory epithelial cells. *Journal of cell science* 112 (Pt 2, 4357–4366.
- Mimori-Kiyosue, Y., I. Grigoriev, G. Lansbergen, H. Sasaki, C. Matsui, F. Severin, N. Galjart, F. Grosveld, I. Vorobjev, S. Tsukita, and A. Akhmanova (2005). CLASP1 and CLASP2 bind to EB1 and regulate microtubule plus-end dynamics at the cell cortex. *Journal of Cell Biology* 168, 141–153.
- Mimori-Kiyosue, Y., N. Shiina, and S. Tsukita (2000). The dynamic behavior of the APC-binding protein EB1 on the distal ends of microtubules. *Current Biology* 10, 865–868.
- Mingle, L. A., N. N. Okuhama, J. Shi, R. H. Singer, J. Condeelis, and G. Liu (2005). Localization of all seven messenger RNAs for the actin-polymerization nucleator Arp2/3 complex in the protrusions of fibroblasts. *Journal of cell science* 118, 2425–33.
- Mitchison, T. and M. Kirschner (1984). Dynamic instability of microtubule growth. *Nature* 312, 237–42.
- Mitra, S. K., D. a. Hanson, and D. D. Schlaepfer (2005). Focal adhesion kinase : in command and control of cell motility. *Nature reviews. Molecular cell biology* 6, 56–68.
- Mitra, S. K. and D. D. Schlaepfer (2006). Integrin-regulated FAK-Src signaling in normal and cancer cells.
- Mogilner, A. and G. Oster (2003). Force Generation by Actin Polymerization II : The Elastic Ratchet and Tethered Filaments. *Biophysical Journal* 84, 1591–1605.
- Mohl, C., N. Kirchgessner, C. Schafer, B. Hoffmann, and R. Merkel (2012). Quantitative mapping of averaged focal adhesion dynamics in

-
- migrating cells by shape normalization. *Journal of Cell Science* 125, 155–165.
- Monier, S., F. Jollivet, I. Janoueix-Lerosey, L. Johannes, and B. Goud (2002). Characterization of novel Rab6-interacting proteins involved in endosome-to-TGN transport. *Traffic (Copenhagen, Denmark)* 3, 289–97.
- Montagnac, G., V. Meas-Yedid, M. Irondelle, A. Castro-Castro, M. Franco, T. Shida, M. V. Nachury, A. Benmerah, J.-C. Olivo-Marin, and P. Chavrier (2013). α TAT1 catalyses microtubule acetylation at clathrin-coated pits. *Nature* 502, 567–70.
- Morrison, E. E., B. N. Wardleworth, J. M. Askham, a. F. Markham, and D. M. Meredith (1998). EB1, a protein which interacts with the APC tumour suppressor, is associated with the microtubule cytoskeleton throughout the cell cycle. *Oncogene* 17, 3471–3477.
- Munemitsu, S., B. Souza, O. Müller, I. Albert, B. Rubinfeld, and P. Polakis (1994). The APC Gene Product Associates with Microtubules in Vivo and Promotes Their Assembly in Vitro. *Cancer Research* 54, 3676–3681.
- Nakamura, M., X. Z. Zhou, and K. P. Lu (2001). Critical role for the EB1 and APC interaction in the regulation of microtubule polymerization. *Current Biology* 11, 1062–1067.
- Näthke, I. (2004). APC at a glance. *Journal of cell science* 117, 4873–4875.
- Näthke, I. (2006). Cytoskeleton out of the cupboard : colon cancer and cytoskeletal changes induced by loss of APC. *Nature reviews. Cancer* 6, 967–974.
- Näthke, I. S., C. L. Adams, P. Polakis, J. H. Sellin, and W. J. Nelson (1996). The adenomatous polyposis coli tumor suppressor protein localizes to plasma membrane sites involved in active cell migration. *Journal of Cell Biology* 134, 165–179.
- Newton, C. N., J. G. Deluca, R. H. Himes, H. P. Miller, M. A. Jordan, and L. Wilson (2002). Intrinsically slow dynamic instability of HeLa

-
- cell microtubules in vitro. *Journal of Biological Chemistry* 277, 42456–42462.
- Nicastro, D., X. Fu, T. Heuser, a. Tso, M. E. Porter, and R. W. Linck (2011). PNAS Plus : Cryo-electron tomography reveals conserved features of doublet microtubules in flagella. *Proceedings of the National Academy of Sciences* 108, E845–E853.
- Nielsen, M. G., F. R. Turner, J. A. Hutchens, and E. C. Raff (2001). Axoneme-specific γ -tubulin specialization : A conserved C-terminal motif specifies the central pair. *Current Biology* 11, 529–533.
- Nishizaka, T., Q. Shi, and M. P. Sheetz (2000). Position-dependent linkages of fibronectin- integrin-cytoskeleton. *Proceedings of the National Academy of Sciences* 97, 692–697.
- Nobes, C. D. and A. Hall (1995). Rho, Rac, and Cdc42 GTPases regulate the assembly of multimolecular focal complexes associated with actin stress fibers, lamellipodia, and filopodia. *Cell* 81, 53–62.
- Nöding, B., H. Herrmann, and S. Köster (2014). Direct observation of subunit exchange along mature vimentin intermediate filaments. *Biophysical journal* 107, 2923–31.
- Nogales, E. and H. W. Wang (2006). Structural intermediates in microtubule assembly and disassembly : How and why ?
- Nogales, E., S. G. Wolf, and K. H. Downing (1998a). Structure of the alpha beta tubulin dimer by electron crystallography. *Nature* 391, 199–203.
- Nogales, E., S. G. Wolf, and K. H. Downing (1998b). Structure of the alpha beta tubulin dimer by electron crystallography. *Nature* 391, 199–203.
- North, B. J., B. L. Marshall, M. T. Borra, J. M. Denu, and E. Verdin (2003). The human Sir2 ortholog, SIRT2, is an NAD⁺-dependent tubulin deacetylase. *Molecular Cell* 11, 437–444.
- Nürnberg, A., T. Kitzing, and R. Grosse (2011). Nucleating actin for invasion. *Nature reviews. Cancer* 11, 177–187.

-
- Odde, D. (1998). Diffusion inside microtubules. *European Biophysics Journal* 27, 514–520.
- Okada, K., F. Bartolini, A. M. Deaconescu, J. B. Moseley, Z. Dogic, N. Grigorieff, G. G. Gundersen, and B. L. Goode (2010). Adenomatous polyposis coli protein nucleates actin assembly and synergizes with the formin mDia1. *Journal of Cell Biology* 189, 1087–1096.
- Oleynikov, Y. and R. H. Singer (1998). RNA localization : Different zipcodes, same postman ?
- Osmani, N., F. Peglion, P. Chavrier, and S. Etienne-Manneville (2010). Cdc42 localization and cell polarity depend on membrane traffic. *Journal of Cell Biology* 191, 1261–1269.
- Osmani, N., N. Vitale, J. P. Borg, and S. Etienne-Manneville (2006). Scrib Controls Cdc42 Localization and Activity to Promote Cell Polarization during Astrocyte Migration. *Current Biology* 16, 2395–2405.
- Palazzo, A. F., C. H. Eng, D. D. Schlaepfer, E. E. Marcantonio, and G. G. Gundersen (2004). Localized stabilization of microtubules by integrin- and {FAK-facilitated} Rho signaling. *Science* 303, 836–839.
- Palazzo, A. F., H. L. Joseph, Y. J. Chen, D. L. Dujardin, A. S. Alberts, K. K. Pfister, R. B. Vallee, and G. G. Gundersen (2001a). Cdc42, dynein, and dynactin regulate MTOC reorientation independent of Rho-regulated microtubule stabilization. *Current Biology* 11, 1536–1541.
- Palazzo, A. F., H. L. Joseph, Y. J. Chen, D. L. Dujardin, A. S. Alberts, K. K. Pfister, R. B. Vallee, and G. G. Gundersen (2001b). Cdc42, dynein, and dynactin regulate MTOC reorientation independent of Rho-regulated microtubule stabilization. *Current Biology* 11, 1536–1541.
- Panda, D., H. P. Miller, A. Banerjee, R. F. Ludueña, and L. Wilson (1994). Microtubule dynamics in vitro are regulated by the tubulin isotype composition. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 91, 11358–11362.

-
- Panetti, T. S. (2002). Tyrosine phosphorylation of paxillin, FAK, and p130CAS : effects on cell spreading and migration. *Frontiers in bioscience : a journal and virtual library* 7, d143–50.
- Parsons, J. T., A. R. Horwitz, and M. a. Schwartz (2010). Cell adhesion : integrating cytoskeletal dynamics and cellular tension. *Nature reviews. Molecular cell biology* 11, 633–43.
- Partridge, M. A. and E. E. Marcantonio (2006). Initiation of attachment and generation of mature focal adhesions by integrin-containing filopodia in cell spreading. *Molecular biology of the cell* 17, 4237–48.
- Paturle, L., J. Wehland, R. L. Margolis, and D. Job (1989). Complete separation of tyrosinated, detyrosinated, and nontyrosinatable brain tubulin subpopulations using affinity chromatography. *Biochemistry* 28, 2698–704.
- Paturle-Lafanechère, L., B. Eddé, P. Denoulet, A. Van Dorsselaer, H. Mazarguil, J. P. Le Caer, J. Wehland, and D. Job (1991). Characterization of a major brain tubulin variant which cannot be tyrosinated. *Biochemistry* 30, 10523–10528.
- Paturle-Lafanechère, L., M. Manier, N. Trigault, F. Pirollet, H. Mazarguil, and D. Job (1994). Accumulation of delta 2-tubulin, a major tubulin variant that cannot be tyrosinated, in neuronal tissues and in stable microtubule assemblies. *J. Cell Sci.* 107 (Pt 6, 1529–1543.
- Peacock, J. G., A. L. Miller, W. D. Bradley, O. C. Rodriguez, D. J. Webb, and A. J. Koleske (2007). The Abl-related gene tyrosine kinase acts through p190RhoGAP to inhibit actomyosin contractility and regulate focal adhesion dynamics upon adhesion to fibronectin. *Molecular biology of the cell* 18, 3860–72.
- Pégliion, F. and S. Etienne-Manneville (2012). N-cadherin expression level as a critical indicator of invasion in non-epithelial tumors.
- Peglion, F., F. Llense, and S. Etienne-Manneville (2014). Adherens junction treadmill during collective migration. *Nature cell biology* 16, 639–51.

-
- Perdiz, D., R. Mackeh, C. Poüs, and A. Baillet (2011). The ins and outs of tubulin acetylation : More than just a post-translational modification ?
- Perez-Moreno, M., C. Jamora, and E. Fuchs (2003). Sticky business : Orchestrating cellular signals at adherens junctions.
- Peris, L., M. Thery, J. Faur??, Y. Saoudi, L. Lafanech??re, J. K. Chilton, P. Gordon-Weeks, N. Galjart, M. Bornens, L. Wordeman, J. Wehland, A. Andrieux, and D. Job (2006a). Tubulin tyrosination is a major factor affecting the recruitment of CAP-Gly proteins at microtubule plus ends. *Journal of Cell Biology* 174, 839–849.
- Peris, L., M. Thery, J. Faur??, Y. Saoudi, L. Lafanech??re, J. K. Chilton, P. Gordon-Weeks, N. Galjart, M. Bornens, L. Wordeman, J. Wehland, A. Andrieux, and D. Job (2006b). Tubulin tyrosination is a major factor affecting the recruitment of CAP-Gly proteins at microtubule plus ends. *Journal of Cell Biology* 174, 839–849.
- Peris, L., M. Wagenbach, L. Lafanechère, J. Brocard, A. T. Moore, F. Kozielski, D. Job, L. Wordeman, and A. Andrieux (2009). Motor-dependent microtubule disassembly driven by tubulin tyrosination. *Journal of Cell Biology* 185, 1159–1166.
- Piperno, G. and M. T. Fuller (1970). Monoclonal Antibodies Specific for an Acetylated Form of α -Tubulin Recognize the Antigen in Cilia and Flagella from a Variety of Organisms. *The Journal of Cell* 101(37), 1–10.
- Piperno, G. and M. T. Fuller (1985). Monoclonal antibodies specific for an acetylated form of α -tubulin recognize the antigen in cilia and flagella from a variety of organisms. *Journal of Cell Biology* 101, 2085–2094.
- Piperno, G., M. LeDizet, and X. J. Chang (1987). Microtubules containing acetylated α -tubulin in mammalian cells in culture. *Journal of Cell Biology* 104, 289–302.
- Ponstingl, H., E. Krauhs, M. Little, and T. Kempf (1981). Complete amino acid sequence of α -tubulin from porcine brain. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 78, 4156–60.

Popchock, A. R., K.-F. Tseng, P. Wang, P. A. Karplus, X. Xiang, W. Qiu, R. D. Vale, D. R. Drummond, J. J. Vicente, L. Wordeman, E. Karsenti, I. Vernos, L. Wordeman, M. Winey, K. Bloom, A. I. Marcus, W. Li, H. Ma, R. J. Cyr, J. C. Ambrose, R. Cyr, S. A. Endow, H. Higuchi, S. A. Endow, D. J. Komma, M. Hatsumi, S. A. Endow, C. E. Walczak, S. Verma, T. J. Mitchison, D. J. Sharp, K. R. Yu, J. C. Sisson, W. Sullivan, J. M. Scholey, G. Goshima, F. Nédélec, R. D. Vale, V. Mountain, J. Matulienė, V. Syrovatkina, P. T. Tran, S. Cai, L. N. Weaver, S. C. Ems-McClung, C. E. Walczak, S. A. Endow, S. Henikoff, L. Soler-Niedziela, M. B. Gordon, L. Howard, D. A. Compton, N. Kim, K. Song, H. B. McDonald, L. S. Goldstein, M. Kwon, M. J. O’Connell, P. B. Meluh, M. D. Rose, N. R. Morris, A. P. Enos, N. R. Morris, W. S. Saunders, M. A. Hoyt, Z. T. Olmsted, A. G. Colliver, T. D. Riehlman, J. L. Paluh, N. L. Prigozhina, R. A. Walker, C. E. Oakley, B. R. Oakley, B. Wang, C. Mieck, E. Jonsson, M. Yamada, R. D. Vale, G. Goshima, R. B. Case, D. W. Pierce, N. Hom-Booher, C. L. Hart, A. J. Hepperla, K. Furuta, M. Braun, D. R. Drummond, R. A. Cross, A. D. McAinsh, G. Fink, J. S. Weinger, M. Qiu, G. Yang, T. M. Kapoor, J. Stumpff, E. P. Sablin, U. Henningsen, M. Schliwa, S. A. Endow, K. W. Waligora, W. J. Walter, I. Machens, F. Rafeian, S. Diez, J. Roostalu, R. A. Walker, E. D. Salmon, S. A. Endow, H. B. McDonald, R. J. Stewart, L. S. Goldstein, A. I. Marcus, J. C. Ambrose, L. Blickley, W. O. Hancock, R. J. Cyr, J. C. Ambrose, W. Li, A. Marcus, H. Ma, R. Cyr, K. Furuta, M. Edamatsu, Y. Maeda, Y. Y. Toyoshima, S. A. Endow, N. F. Endres, C. Yoshioka, R. A. Milligan, R. D. Vale, M. Yun, T. G. Wendt, X. Su, P. L. Chavali, M. Yukawa, C. Ikebe, T. Toda, S. A. Endow, K.-F. Shen, S. A. Osmani, K. Scheffler, R. Minnes, V. Fraisier, A. Paoletti, P. T. Tran, L. R. Sproul, D. J. Anderson, A. T. Mackey, W. S. Saunders, S. P. Gilbert, A. Gerson-Gurwitz, V. Fridman, M. Edamatsu, H. P. Erickson, A. A. Hyman, A. J. Roberts, B. S. Goodman, S. L. Reck-Peterson, W. Qiu, H. Lu, M. Y. Ali, C. S. Bookwalter, D. M. Warshaw, and K. M. Trybus (2017). The mitotic kinesin-14 KlpA contains a context-dependent directionality switch. *Nature Communications* 8, 13999.

Powell, E. M. and H. M. Geller (1999). Dissection of astrocyte-mediated cues in neuronal guidance and process extension. *GLIA* 26, 73–83.

-
- Prigozhina, N. L. and C. M. Waterman-Storer (2004). Protein Kinase D-Mediated Anterograde Membrane Trafficking Is Required for Fibroblast Motility. *Current Biology* 14, 88–98.
- Prota, A. E., M. M. Magiera, M. Kuijpers, K. Bargsten, D. Frey, M. Wieser, R. Jaussi, C. C. Hoogenraad, R. A. Kammerer, C. Janke, and M. O. Steinmetz (2013). Structural basis of tubulin tyrosination by tubulin tyrosine ligase. *Journal of Cell Biology* 200, 259–270.
- Raybin, D. and M. Flavin (1975). An enzyme tyrosylating alpha-tubulin and its role in microtubule assembly. *Biochemical and biophysical research communications* 65, 1088–95.
- Redeker, V., N. Levilliers, J. M. Schmitter, J. P. Le Caer, J. Rossier, A. Adoutte, and M. H. Bré (1994). Polyglycylation of tubulin : a posttranslational modification in axonemal microtubules. *Science (New York, N.Y.)* 266, 1688–1691.
- Redmond, T., E. R. Sanchez, E. H. Bresnick, M. J. Schlesinger, D. O. Toft, W. B. Pratt, and M. J. Welsh (1989). Immunofluorescence colocalization of the 90-kDa heat-shock protein and microtubules in interphase and mitotic mammalian cells. *Eur J Cell Biol* 50, 66–75.
- Reed, N. a., D. Cai, T. L. Blasius, G. T. Jih, E. Meyhofer, J. Gaertig, and K. J. Verhey (2006). Microtubule Acetylation Promotes Kinesin-1 Binding and Transport. *Current Biology* 16, 2166–2172.
- Regnard, C., D. Fesquet, C. Janke, D. Boucher, E. Desbruyères, A. Koulakoff, C. Insina, P. Travo, and B. Eddé (2003). Characterisation of PGs1, a subunit of a protein complex co-purifying with tubulin polyglutamylase. *Journal of cell science* 116, 4181–4190.
- Ren, X. D., W. B. Kiosses, D. J. Sieg, C. a. Otey, D. D. Schlaepfer, and M. a. Schwartz (2000). Focal adhesion kinase suppresses Rho activity to promote focal adhesion turnover. *Journal of cell science* 113, 3673–3678.
- Rid, R., N. Schiefermeier, I. Grigoriev, J. V. Small, and I. Kaverina (2005). The last but not the least : The origin and significance of trailing adhesions in fibroblastic cells. *Cell Motility and the Cytoskeleton* 61, 161–171.

-
- Rinnerthaler, G., B. Geiger, and J. V. Small (1988). Contact formation during fibroblast locomotion : Involvement of membrane ruffles and microtubules. *Journal of Cell Biology* 106, 747–760.
- Robson, S. J. and R. D. Burgoyne (1989). Differential localisation of tyrosinated, detyrosinated, and acetylated alpha-tubulins in neurites and growth cones of dorsal root ganglion neurons. *Cell motility and the cytoskeleton* 12, 273–82.
- Roca-Cusachs, P. P., T. T. Iskratsch, and M. P. M. P. Sheetz (2012). Finding the weakest link : exploring integrin-mediated mechanical molecular pathways. *Journal of Cell Science* 125, 3025–3038.
- Rodriguez, O. C., A. W. Schaefer, C. a. Mandato, P. Forscher, W. M. Bement, and C. M. Waterman-Storer (2003). Conserved microtubule-actin interactions in cell movement and morphogenesis. *Nature cell biology* 5, 599–609.
- Rodriguez de la Vega, M., R. G. Sevilla, A. Hermoso, J. Lorenzo, S. Tanco, A. Diez, L. D. Fricker, J. M. Bautista, and F. X. Avilés (2007). Nna1-like proteins are active metallopeptidases of a new and diverse M14 subfamily. *The FASEB journal : official publication of the Federation of American Societies for Experimental Biology* 21, 851–865.
- Rogowski, K., J. van Dijk, M. M. Magiera, C. Bosc, J. C. Deloulme, A. Bosson, L. Peris, N. D. Gold, B. Lacroix, M. B. Grau, N. Bec, C. Larroque, S. Desagher, M. Holzer, A. Andrieux, M. J. Moutin, and C. Janke (2010). A family of protein-deglutamylating enzymes associated with neurodegeneration. *Cell* 143, 564–578.
- Rooney, C., G. White, A. Nazgiewicz, S. Woodcock, K. Anderson, C. Ballestrem, and A. Malliri (2010). The Rac activator STEF (Tiam2) regulates cell migration by microtubule-mediated focal adhesion disassembly. *EMBO reports* 11, 292–298.
- Rossé, C., A. Hatzoglou, M.-C. Parrini, M. A. White, P. Chavrier, and J. Camonis (2006). RalB Mobilizes the Exocyst To Drive Cell Migration. *MOLECULAR AND CELLULAR BIOLOGY* 26, 727–734.

-
- Sabatini, P. J. B., M. Zhang, R. Silverman-Gavrila, M. P. Bendeck, and B. L. Langille (2008). Homotypic and endothelial cell adhesions via N-cadherin determine polarity and regulate migration of vascular smooth muscle cells. *Circulation Research* 103, 405–412.
- Sakamoto, Y., B. Bo? ?da, and S. Etienne-Manneville (2013). APC binds intermediate filaments and is required for their reorganization during cell migration. *Journal of Cell Biology* 200, 249–258.
- Salmon, W. C., M. C. Adams, and C. M. Waterman-Storer (2002). Dual-wavelength fluorescent speckle microscopy reveals coupling of microtubule and actin movements in migrating cells. *Journal of Cell Biology* 158, 31–37.
- Schaedel, L., K. John, J. Gaillard, M. V. Nachury, L. Blanchoin, and M. Th?ry (2015). Microtubules self-repair in response to mechanical stress. *Nature materials* 14, 1156–63.
- Schaller, M. D., J. D. Hildebrand, and J. T. Parsons (1999). Complex formation with focal adhesion kinase : A mechanism to regulate activity and subcellular localization of Src kinases. *Molecular biology of the cell* 10, 3489–3505.
- Schatten, G., C. Simerly, D. J. Asai, E. Sz ? ?ke, P. Cooke, and H. Schatten (1988). Acetylated ??-tubulin in microtubules during mouse fertilization and early development. *Developmental Biology* 130, 74–86.
- Schliwa, M., U. Euteneuer, R. Gr?f, and M. Ueda (1999). Centrosomes, microtubules and cell migration. *Biochemical Society symposium* 65, 223–231.
- Schmoranzer, J. (2003). Migrating fibroblasts perform polarized, microtubule-dependent exocytosis towards the leading edge. *Journal of Cell Science* 116, 4513–4519.
- Schmoranzer, J., J. P. Fawcett, M. Segura, S. Tan, R. B. Vallee, T. Pawson, and G. G. Gundersen (2009). Par3 and Dynein Associate to Regulate Local Microtubule Dynamics and Centrosome Orientation during Migration. *Current Biology* 19, 1065–1074.

-
- Schmoranzner, J. and S. M. Simon (2003). Role of microtubules in fusion of post-Golgi vesicles to the plasma membrane. *Molecular biology of the cell* 14, 1558–1569.
- Schneider, L., C. M. Stock, P. Dieterich, B. H. Jensen, L. B. Pedersen, P. Satir, A. Schwab, S. r. T. Christensen, and S. F. Pedersen (2009). The Na⁺/H⁺ exchanger NHE1 is required for directional migration stimulated via PDGFR-?? in the primary cilium. *Journal of Cell Biology* 185, 163–176.
- Schulze, E., D. J. Asai, J. C. Bulinski, and M. Kirschner (1987). Posttranslational modification and microtubule stability. *Journal of Cell Biology* 105(November), 2167–2177.
- Schuyler, S. C. and D. Pellman (2001). Microtubule "plus-end-tracking proteins" : The end is just the beginning.
- Schwartzman, M., M. Palma, J. Sable, J. Abramson, X. Hu, M. P. Sheetz, and S. J. Wind (2011). Nanolithographic control of the spatial organization of cellular adhesion receptors at the single-molecule level. *Nano Letters* 11, 1306–1312.
- Schwer, H. D., P. Lecine, S. Tiwari, J. E. Italiano, J. H. Hartwig, and R. A. Shivdasani (2001). A lineage-restricted and divergent β -tubulin isoform is essential for the biogenesis, structure and function of blood platelets. *Current Biology* 11, 579–586.
- Seetapun, D., B. T. Castle, A. J. McIntyre, P. T. Tran, and D. J. Odde (2012). Estimating the microtubule GTP cap size in vivo. *Current Biology* 22, 1681–1687.
- Seitz, A., H. Kojima, K. Oiwa, E. M. Mandelkow, Y. H. Song, and E. Mandelkow (2002). Single-molecule investigation of the interference between kinesin, tau and MAP2c. *EMBO Journal* 21, 4896–4905.
- Shabbir, S. H., M. M. Cleland, R. D. Goldman, and M. Mrksich (2014). Geometric control of vimentin intermediate filaments. *Biomaterials* 35, 1359–1366.
- Shang, Y., B. Li, and M. A. Gorovsky (2002). *Tetrahymena thermophila* contains a conventional ??-tubulin that is differentially required for

the maintenance of different microtubule-organizing centers. *Journal of Cell Biology* 158, 1195–1206.

Shaye, D. D., J. Casanova, and M. Llimargas (2008). Modulation of intracellular trafficking regulates cell intercalation in the *Drosophila* trachea. *Nature Cell Biology* 10, 964–970.

Sherwin, T., A. Schneider, R. Sasse, T. Seebeck, and K. Gull (1987). Distinct localization and cell cycle dependence of COOH terminally tyrosinolated γ -tubulin in the microtubules of *Trypanosoma brucei brucei*. *Journal of Cell Biology* 104, 439–446.

Shi, Q. and D. Boettiger (2003). A novel mode for integrin-mediated signaling : tethering is required for phosphorylation of FAK Y397. *Molecular Biology of the Cell* 14, 4306–4315.

Shida, T., J. G. Cueva, Z. Xu, M. B. Goodman, and M. V. Nachury (2010). The major alpha-tubulin K40 acetyltransferase alphaTAT1 promotes rapid ciliogenesis and efficient mechanosensation. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 107, 21517–21522.

Siegrist, S. E. and C. Q. Doe (2007). Microtubule-induced cortical cell polarity.

Sirajuddin, M., L. M. Rice, and R. D. Vale (2014). Regulation of microtubule motors by tubulin isoforms and post-translational modifications. *Nature cell biology* 16, 335–44.

Slep, K. C., S. L. Rogers, S. L. Elliott, H. Ohkura, P. A. Kolodziej, and R. D. Vale (2005). Structural determinants for EB1-mediated recruitment of APC and spectraplakins to the microtubule plus end. *Journal of Cell Biology* 168, 587–598.

Small, J. V., B. Geiger, I. Kaverina, and A. Bershadsky (2002). How do microtubules guide migrating cells? *Nature reviews. Molecular cell biology* 3, 957–964.

Smilenov, L. B., A. Mikhailov, R. J. Pelham, E. E. Marcantonio, and G. G. Gundersen (1999). Focal Adhesion Motility Revealed in Stationary Fibroblasts. *Science* 286, 1172–1174.

-
- Song, Y. and S. T. Brady (2015). Post-translational modifications of tubulin : Pathways to functional diversity of microtubules.
- Song, Y., L. L. Kirkpatrick, A. B. Schilling, D. L. Helseth, N. Chabot, J. W. Keillor, G. V. W. Johnson, and S. T. Brady (2013). Transglutaminase and Polyamination of Tubulin : Posttranslational Modification for Stabilizing Axonal Microtubules. *Neuron* 78, 109–123.
- Soppina, V., J. F. Herbstman, G. Skiniotis, and K. J. Verhey (2012a). Luminal Localization of β -tubulin K40 Acetylation by Cryo-EM Analysis of Fab-Labeled Microtubules. *PLoS ONE* 7.
- Soppina, V., J. F. Herbstman, G. Skiniotis, and K. J. Verhey (2012b). Luminal Localization of α -tubulin K40 Acetylation by Cryo-EM Analysis of Fab-Labeled Microtubules. *PLoS ONE* 7(10), 1–9.
- Souto-Padron, T., N. L. Cunha e Silva, and W. de Souza (1993). Acetylated alpha-tubulin in *Trypanosoma cruzi* : immunocytochemical localization. *Memorias do Instituto Oswaldo Cruz* 88, 517–528.
- Spiczka, K. S. and C. Yeaman (2008). Ral-regulated interaction between Sec5 and paxillin targets Exocyst to focal complexes during cell migration. *Journal of cell science* 121, 2880–2891.
- Stehbens, S. and T. Wittmann (2012). Targeting and transport : How microtubules control focal adhesion dynamics.
- Stehbens, S. J., M. Paszek, H. Pemble, A. Ettinger, S. Gierke, and T. Wittmann (2014). CLASPs link focal-adhesion-associated microtubule capture to localized exocytosis and adhesion site turnover. *Nature cell biology* 16, 558–570.
- Sullivan, K. F. (1988). Structure and utilization of tubulin isotypes. *Annual review of cell biology* 4, 687–716.
- Sun, X., J. H. Park, J. Gumerson, Z. Wu, A. Swaroop, H. Qian, A. Roll-Mecak, and T. Li (2016). Loss of RPGR glutamylation underlies the pathogenic mechanism of retinal dystrophy caused by TTLL5 mutations. *Proceedings of the National Academy of Sciences* 113, E2925–E2934.

-
- Sütterlin, C. and A. Colanzi (2010). The Golgi and the centrosome : Building a functional partnership.
- Szyk, A., A. M. Deaconescu, G. Piszczek, and A. Roll-Mecak (2011). Tubulin tyrosine ligase structure reveals adaptation of an ancient fold to bind and modify tubulin. *Nature Structural & Molecular Biology* 18, 1250–1258.
- Szyk, A., A. M. Deaconescu, J. Spector, B. Goodman, M. L. Valenstein, N. E. Ziolkowska, V. Kormendi, N. Grigorieff, and A. Roll-Mecak (2014). Molecular basis for age-dependent microtubule acetylation by tubulin acetyltransferase. *Cell* 157, 1405–1415.
- Takeichi, M. (2014). Dynamic contacts : rearranging adherens junctions to drive epithelial remodelling. *Nature reviews. Molecular cell biology* 15, 397–410.
- Ten Klooster, J. P., Z. M. Jaffer, J. Chernoff, and P. L. Hordijk (2006). Targeting and activation of Rac1 are mediated by the exchange factor ??-Pix. *Journal of Cell Biology* 172, 759–769.
- Theveneau, E. and R. Mayor (2012). Cadherins in collective cell migration of mesenchymal cells.
- Tolias, K. F., L. C. Cantley, and C. L. Carpenter (1995). Rho family GTPases bind to phosphoinositide kinases. *Journal of Biological Chemistry* 270, 17656–17659.
- Topalidou, I., C. Keller, N. Kalebic, K. C. Q. Nguyen, H. Somhegyi, K. A. Politi, P. Heppenstall, D. H. Hall, and M. Chalfie (2012). Genetically separable functions of the MEC-17 tubulin acetyltransferase affect microtubule organization. *Current Biology* 22, 1057–1065.
- Tran, A. D.-A., T. P. Marmo, A. a. Salam, S. Che, E. Finkelstein, R. Kabarriti, H. S. Xenias, R. Mazitschek, C. Hubbert, Y. Kawaguchi, M. P. Sheetz, T.-P. Yao, and J. C. Bulinski (2007). HDAC6 deacetylation of tubulin modulates dynamics of cellular adhesions. *Journal of cell science* 120, 1469–1479.
- Treat, X., Z. Chen, and K. Jacobson (2012). Cell migration. *Comprehensive Physiology* 2, 2369–92.

-
- Ueno, H., A. Tomiyama, H. Yamaguchi, T. Uekita, T. Shirakihara, K. Nakashima, N. Otani, K. Wada, R. Sakai, H. Arai, and K. Mori (2015). Augmentation of invadopodia formation in temozolomide-resistant or adopted glioma is regulated by c-Jun terminal kinase-paxillin axis. *Biochemical and Biophysical Research Communications* 468(1-2), 240–247.
- Valenzuela-Fernández, A., J. R. Cabrero, J. M. Serrador, and F. Sánchez-Madrid (2008). HDAC6 : a key regulator of cytoskeleton, cell migration and cell-cell interactions.
- Van Dijk, J., J. Miro, J. M. Strub, B. Lacroix, A. Van Dorsse-laer, B. Edde, and C. Janke (2008). Polyglutamylation is a post-translational modification with a broad range of substrates. *Journal of Biological Chemistry* 283(7), 3915–3922.
- Vaughan, R. B. and J. P. Trinkaus (1966). Movements of epithelial cell sheets in vitro. *J. Cell Sci. i*, 407–413.
- Vega, F. M. and A. J. Ridley (2008). Rho GTPases in cancer cell biology.
- Veland, I. R. n., L. Lindbæ k, and S. r. T. Christensen (2014). Linking the primary cilium to cell migration in tissue repair and brain development.
- ven der vaart B, akhmanova A, s. A. (2009). Regulation of microtubule dynamic instability. *biochem soc trans*.
- Vicente-Manzanares, M., X. Ma, R. Adelstein, and A. Horwitz (2009). Non-muscle myosin II takes centre stage in cell adhesion and migration. *Nature Reviews Molecular Cell Biology* 10, 778–790.
- Vicente-Manzanares, M., K. Newell-Litwa, A. I. Bachir, L. A. Whitmore, and A. R. Horwitz (2011). Myosin IIA/IIB restrict adhesive and protrusive signaling to generate front-back polarity in migrating cells. *Journal of Cell Biology* 193, 381–396.
- Vinogradova, T., P. M. Miller, and I. Kaverina (2009). Microtubule network asymmetry in motile cells : Role of Golgi-derived array.
- Wade, R. H. (2007). Microtubules : an overview. *Methods in molecular medicine* 137, 1–16.

-
- Wade, R. H. (2009). On and around microtubules : An overview.
- Wade, R. H., D. Chrétien, and D. Job (1990). Characterization of microtubule protofilament numbers. How does the surface lattice accommodate? *Journal of Molecular Biology* 212, 775–786.
- Wadsworth, P. (1999). Regional regulation of microtubule dynamics in polarized, motile cells. *Cell Motility and the Cytoskeleton* 42, 48–59.
- Walcott, S., D. H. Kim, D. Wirz, and S. X. Sun (2011). Nucleation and Decay initiation are the stiffness-sensitive phases of focal adhesion maturation. *Biophysical Journal* 101, 2919–2928.
- Walter, W. J., V. Beránek, E. Fischermeier, and S. Diez (2012). Tubulin Acetylation alone does not affect kinesin-1 velocity and run length in vitro. *PLoS ONE* 7(8), 1–5.
- Wang, F. and Q. Tong (2009). SIRT2 Suppresses Adipocyte Differentiation by Deacetylating FOXO1 and Enhancing FOXO1’s Repressive Interaction with PPAR γ . *Molecular biology of the cell* 20, 801–808.
- Wang, Y., A. Arjonen, J. Pouwels, H. Ta, P. Pausch, G. Bange, U. Engel, X. Pan, O. T. Fackler, J. Ivaska, and R. Grosse (2015, August). Formin-like 2 Promotes β 1-Integrin Trafficking and Invasive Motility Downstream of PKC α . *Developmental cell* 34(4), 475–83.
- Waterman-Storer, C. M. and E. Salmon (1999). Positive feedback interactions between microtubule and actin dynamics during cell motility.
- Waterman-Storer, C. M. and E. D. Salmon (1997). Actomyosin-based retrograde flow of microtubules in the lamella of migrating epithelial cells influences microtubule dynamic instability and turnover and is associated with microtubule breakage and treadmilling. *Journal of Cell Biology* 139, 417–434.
- Waterman-Storer, C. M., R. a. Worthylake, B. P. Liu, K. Burridge, and E. D. Salmon (1999a). Microtubule growth activates Rac1 to promote lamellipodial protrusion in fibroblasts. *Nature cell biology* 1, 45–50.

-
- Waterman-Storer, C. M., R. a. Worthylake, B. P. Liu, K. Burridge, and E. D. Salmon (1999b). Microtubule growth activates Rac1 to promote lamellipodial protrusion in fibroblasts. *Nature cell biology* 1, 45–50.
- Webb, D. J., K. Donais, L. A. Whitmore, S. M. Thomas, C. E. Turner, J. T. Parsons, and A. F. Horwitz (2004). FAK–Src signalling through paxillin, ERK and MLCK regulates adhesion disassembly. *Nature cell biology* 6, 154–161.
- Webster, D. R. and G. G. Borisy (1989). Microtubules are acetylated in domains that turn over slowly. *Journal of cell science* 92 (Pt 1), 57–65.
- Webster, D. R., G. G. Gundersen, J. C. Bulinski, and G. G. Borisy (1987). Assembly and turnover of deetyrosinated tubulin in vivo. *Journal of Cell Biology* 105, 265–276.
- Wehenkel, A. and C. Janke (2014). Towards elucidating the tubulin code. *Nature cell biology* 16, 303–5.
- Weijer, C. J. (2009). Collective cell migration in development. *Journal of cell science* 122, 3215–23.
- Wen, Y., C. H. Eng, J. Schmoranzer, N. Cabrera-Poch, E. J. S. Morris, M. Chen, B. J. Wallar, A. S. Alberts, and G. G. Gundersen (2004). EB1 and APC bind to mDia to stabilize microtubules downstream of Rho and promote cell migration. *Nature cell biology* 6, 820–830.
- Witte, H., D. Neukirchen, and F. Bradke (2008). Microtubule stabilization specifies initial neuronal polarization. *Journal of Cell Biology* 180, 619–632.
- Wloga, D. and J. Gaertig (2010). Post-translational modifications of microtubules. *Journal of cell science* 123, 3447–55.
- Wloga, D., E. Joachimiak, P. Louka, and J. Gaertig (2016). Post-translational Modifications of Tubulin and Cilia. *Cold Spring Harbor perspectives in biology*.
- Wolfenson, H., Y. I. Henis, B. Geiger, and A. D. Bershadsky (2009). The heel and toe of the cell’s foot : A multifaceted approach for

understanding the structure and dynamics of focal adhesions. In *Cell Motility and the Cytoskeleton*, Volume 66, pp. 1017–1029.

Wolff, A., B. de Néchaud, D. Chillet, H. Mazarguil, E. Desbruyères, S. Audebert, B. Eddé, F. Gros, and P. Denoulet (1992). Distribution of glutamylated alpha and beta-tubulin in mouse tissues using a specific monoclonal antibody, GT335. *European journal of cell biology* 59, 425–432.

Wu, J., C. de Heus, Q. Liu, B. P. Bouchet, I. Noordstra, K. Jiang, S. Hua, M. Martin, C. Yang, I. Grigoriev, E. A. Katrukha, A. F. M. Altelaar, C. C. Hoogenraad, R. Z. Qi, J. Klumperman, and A. Akhmanova (2016). Molecular Pathway of Microtubule Organization at the Golgi Apparatus. *Developmental Cell* 39, 44–60.

Wu, X., Q. T. Shen, D. S. Oristian, C. P. Lu, Q. Zheng, H. W. Wang, and E. Fuchs (2011). Skin stem cells orchestrate directional migration by regulating microtubule-ACF7 connections through GSK3 β . *Cell* 144, 341–352.

Yap, A. S., C. M. Niessen, and B. M. Gumbiner (1998). The juxta-membrane region of the cadherin cytoplasmic tail supports lateral clustering, adhesive strengthening, and interaction with p120(ctn). *Journal of Cell Biology* 141, 779–789.

Yeung, T., P. C. Georges, L. A. Flanagan, B. Marg, M. Ortiz, M. Funaki, N. Zahir, W. Ming, V. Weaver, and P. A. Janmey (2005). Effects of substrate stiffness on cell morphology, cytoskeletal structure, and adhesion. *Cell Motility and the Cytoskeleton* 60, 24–34.

Yu, I., C. P. Garnham, and A. Roll-Mecak (2015). Writing and reading the tubulin code. *Journal of Biological Chemistry* 290, 17163–17172.

Zaidel-Bar, R., M. Cohen, L. Addadi, and B. Geiger (2004). Hierarchical assembly of cell-matrix adhesion complexes. *Biochemical Society transactions* 32, 416–20.

Zaidel-Bar, R., S. Itzkovitz, A. Ma'ayan, R. Iyengar, and B. Geiger (2007). Functional atlas of the integrin adhesome. *Nature Cell Biology* 9, 858–867.

-
- Zamir, E., M. Katz, Y. Posen, N. Erez, K. M. Yamada, B.-Z. Katz, S. Lin, D. C. Lin, A. Bershadsky, Z. Kam, and B. Geiger (2000). Dynamics and segregation of cell– matrix adhesions in cultured fibroblasts. *Nature Cell Biology* 2, 191–196.
- Zaoui, K., K. Benseddik, P. Daou, D. Salaün, and A. Badache (2010). ErbB2 receptor controls microtubule capture by recruiting ACF7 to the plasma membrane of migrating cells. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 107, 18517–22.
- Zhang, X., Z. Yuan, Y. Zhang, S. Yong, A. Salas-Burgos, J. Koomen, N. Olashaw, J. T. Parsons, X. J. Yang, S. R. Dent, T. P. Yao, W. S. Lane, and E. Seto (2007a). HDAC6 Modulates Cell Motility by Altering the Acetylation Level of Cortactin. *Molecular Cell* 27, 197–213.
- Zhang, X., Z. Yuan, Y. Zhang, S. Yong, A. Salas-Burgos, J. Koomen, N. Olashaw, J. T. Parsons, X. J. Yang, S. R. Dent, T. P. Yao, W. S. Lane, and E. Seto (2007b). HDAC6 Modulates Cell Motility by Altering the Acetylation Level of Cortactin. *Molecular Cell* 27, 197–213.
- Zhang, Y., B. Gilquin, S. Khochbin, and P. Matthias (2006). Two catalytic domains are required for protein deacetylation. *Journal of Biological Chemistry* 281, 2401–2404.
- Zhang, Y., N. Li, C. Caron, G. Matthias, D. Hess, S. Khochbin, and P. Matthias (2003). HDAC-6 interacts with and deacetylates tubulin and microtubules in vivo. *EMBO Journal* 22(5), 1168–1179.
- Zilberman, Y., C. Ballestrem, L. Carramusa, R. Mazitschek, S. Khochbin, and A. Bershadsky (2009). Regulation of microtubule dynamics by inhibition of the tubulin deacetylase HDAC6. *Journal of cell science* 122, 3531–3541.
- Zimmerman, B., T. Volberg, and B. Geiger (2004). Early molecular events in the assembly of the focal adhesion-stress fiber complex during fibroblast spreading. *Cell Motility and the Cytoskeleton* 58, 143–159.

Zou, H., Y. Wu, M. Navre, and B. C. Sang (2006). Characterization of the two catalytic domains in histone deacetylase 6. *Biochemical and Biophysical Research Communications* 341, 45–50.

Zuo, Q., W. Wu, X. Li, L. Zhao, and W. Chen (2012). HDAC6 and SIRT2 promote bladder cancer cell migration and invasion by targeting cortactin. *Oncology Reports* 27, 819–824.

Table des figures

1.1	Les différentes étapes de la migration cellulaire en deux dimensions	6
1.2	Polarisation et migration d'une cellule individuelle . . .	7
1.3	Différents exemples de migration individuelle	8
1.4	Rôle des cellules directrices durant la migration collective	10
1.5	Rôle et dynamique des jonctions adhérentes durant la migration collective	13
1.6	Les astrocytes, des cellules gliales	14
1.7	Le modèle de migration astrocytaire <i>in vitro</i>	16
1.8	La dynamique des filaments d'actine	18
1.9	La dynamique d'assemblage des filaments intermédiaires	19
1.10	Quelques exemples de polarité cellulaire <i>in vivo</i>	21
1.11	L'orientation de l'axe noyau-centrosome dans les cellules en migration	22
1.12	Les fonctions associées à l'orientation de l'axe noyau-centrosome	23
1.13	Les voies de signalisation contribuant à la polarisation du réseau de microtubules et à la réorientation du centrosome dans les astrocytes	26
1.14	Les jonction intercellulaires	28
1.15	Les jonctions adhérentes	29
1.16	Modèle d'interaction entre les différents composants des jonctions adhérentes	31

1.17	Les jonction intercellulaires	33
1.18	Dynamique de l'adhésion à la matrice extra-cellulaire .	34
1.19	Composition moléculaires des plaques d'adhérence du- rant leur maturation	35
1.20	La famille des intégrines	36
1.21	L'association des intégrines entre elles et le cytosquelette d'actine et les signaux induits	41
1.22	L'intégration des intégrines à l'avant induit l'activation de Cdc42	42
2.1	Structure du dimère de tubuline α et β	46
2.2	Structure d'un microtubule	48
2.3	Les différents organisations du réseau de microtubules .	49
2.4	L'instabilité dynamique des microtubules	51
2.5	Les différents composants modulant l'instabilité dyna- mique des microtubules	52
2.6	La classification structurale des +TIPs	53
2.7	Structure d'un dimère de protéine EB	55
2.8	Les différents domaines et fonctions d'APC	56
2.9	Localisation d'APC dans les astrocytes	57
2.10	Les différents isotypes de tubuline α - et β humaine et les modifications post-traductionnelles associées à leur queue C-terminale	59
2.11	Représentation schématique du dimère d' α - et β -tubuline et les modifications post-traductionnelles qui lui sont associées	60
2.12	Mécanisme de polyglutamylatation	61
2.13	Les enzymes catalysant la polyglutamylatation et la dé- glutamylatation	63
2.14	localisation cellulaire et subcellulaire de la polyglutamy- lation	64

2.15	Diversité des queues carboxy-terminale de la tubuline .	66
2.16	Les enzymes impliquées dans tyrosination/detyrosination	67
2.17	Les autres modifications post-traductionnelles de la tubuline	70
2.18	Localisation de l'acétylation de la lysine 40 de la tubuline α sur la surface luminale des microtubules	72
2.19	Les enzymes impliquées dans l'acétylation des microtubules	73
2.20	Structure d' α TAT1	74
3.1	Organisation de l'actine et des microtubules dans la protrusions cellulaire	84
3.2	Le rôle des microtubules dans la protrusion cellulaire .	85
3.3	Role d'APC dans la migration cellulaire	87
3.4	Coopération entre les trois éléments du cytosquelette .	89
3.5	Régulation de la dynamique des plaques d'adhérence par les microtubules durant la migration	96
3.6	Les interactions entre les +TIP des microtubules et les plaques d'adhérence	101
3.7	Le trafic vésiculaire via les microtubules est impliqué dans la dynamique des plaques d'adhérence	102
1.1	Anticorps reconnaissant spécifiquement la polyglutamylation	118
1.2	Profil d'expression de la glutamylation dans les astrocytes à 8h de migration	120
1.3	Méthode d'étude de la polarité dans les astrocytes . . .	121
1.4	La déplétion de TTL1 n'affecte pas la polarité du centrosome	123
1.5	Profil de glutamylation du cil primaire dans les astrocytes	124
1.6	Polarité du cil primaire dans les astrocytes en migration	125
1.7	La déplétion de TTL1 n'affecte pas l'orientation du cil primaire	126

1.8	La sur-expression de CCP5 n'a pas d'effet sur la polarité du centrosome	127
1.9	La sur-expression de CCP5 n'a pas d'effet sur la polarité du cil primaire	128
2.1	L'acétylation et la détyrosination des microtubules	132
2.2	Diminution du niveau d'acétylation des microtubules en ciblant α TAT1	135
2.3	Diminution du niveau de détyrosination des microtubules en sur-exprimant TTL	137
2.4	Le niveau d'acétylation des microtubules régule la vitesse de migration des astrocytes	139
2.5	Le niveau de détyrosination des microtubules régule la vitesse de migration des astrocytes	141
2.6	L'inhibition d'HDAC6 hyper-acétyle la totalité du réseau de microtubules	143
2.7	L'inhibition d'HDAC6 affecte la vitesse de migration des astrocytes	145
3.1	Les microtubules situés à proximité des plaques d'adhérence sont acétylés	149
3.2	L'acétyl-transférase α TAT1 est localisée au niveau des microtubules et des plaques d'adhérence	150
3.3	La déplétion d' α TAT1 induit une augmentation du nombre de plaques d'adhérence	152
3.4	La diminution du niveau de détyrosination des microtubules n'affecte ni le nombre ni la taille des plaques d'adhérence	154
3.5	La déplétion d' α TAT1 induit une perturbation de la distribution des plaques d'adhérence durant la migration des astrocytes	157
3.6	La diminution du niveau de détyrosination des microtubules n'affecte pas la distribution des plaques d'adhérence durant la migration des astrocytes	158

3.7	La déplétion d' α TAT1 affecte la dynamique des plaques d'adhérence	161
3.8	L'hypo-acétylation des microtubules par sur-expression d'HDAC6 n'affecte pas la dynamique des plaques d'adhérence	164
3.9	L'hyper-acétylation des microtubules par inhibition d'HDAC6 affecte la dynamique des plaques d'adhérence mais pas leur distribution	166
3.10	La sur-expression de l'acétyltransférase mutée au niveau de son site catalytique n'affecte ni le nombre ni la distribution des plaques d'adhérence	167
3.11	Sauvetage phénotypique par surexpression d' α TAT1.	168
3.12	Lien entre APC et l'acétylation des microtubules	170
3.13	La déplétion d'APC induit une perturbation de la dynamique des plaques d'adhérence	172
4.1	MICAL3 et ELK sont recrutés à proximité des plaques d'adhérence	176
4.2	α TAT1 est nécessaire au recrutement de MICAL3 mais pas de ELK	177
4.3	la déplétion d' α TAT1 induit une perturbation de la fusion des vésicules Rab6A positives	180
4.4	Le trafic vésiculaire dépendant de Rab6A est nécessaire à la dynamique des plaques d'adhérence	182
5	Polyglutamylation des microtubules dans les neurones	187
6	Augmentation du niveau de polyglutamylation des microtubules dans les astrocytes qui surexpriment TLL5	189
7	Différences de localisation de l'acétylation et de la détyrosination des microtubules	191
8	La surexpression de la tubuline mutée au niveau de la lysine 40 n'induit pas de diminution du niveau d'acétylation	193

9	La déplétion de MICAL3 induit une diminution du niveau d'acétylation des microtubules	197
10	Modèle de régulation de la dynamique des plaques d'adhérence par l'acétylation des microtubules	201
