



**HAL**  
open science

# Etude de l'implication de CRMP4, un partenaire de MAP6, dans la voie de signalisation sémaphorine 3E

Benoit Boulan

► **To cite this version:**

Benoit Boulan. Etude de l'implication de CRMP4, un partenaire de MAP6, dans la voie de signalisation sémaphorine 3E. Biologie animale. Université Grenoble Alpes, 2018. Français. NNT : 2018GREAV001 . tel-02628498

**HAL Id: tel-02628498**

**<https://theses.hal.science/tel-02628498v1>**

Submitted on 26 May 2020

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

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

## **THÈSE**

Pour obtenir le grade de

**DOCTEUR DE L'UNIVERSITE GRENOBLE ALPES**

Spécialité : **Neurosciences / Neurobiologie**

Arrêté ministériel : 25 mai 2016

Présentée par

**Benoit BOULAN**

Thèse dirigée par **Jean-Christophe DELOULME**  
et codirigée par **Sylvie GORY-FAURE**

préparée au sein du laboratoire  
**Grenoble Institut des Neurosciences**, équipe "Physiopathologie  
du cytosquelette" dirigée par Annie Andrieux.

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

**Etude de l'implication de CRMP4, un  
partenaire de MAP6, dans la voie de  
signalisation sémaphorine 3E.**

**Study of the function of CRMP4, a MAP6  
partner, in semaphorin 3E signaling  
pathway.**

Thèse soutenue publiquement le **26 janvier 2018**,  
devant le jury composé de :

**Monsieur Fabrice ANGO**

Directeur de Recherche, Institut de Génomique Fonctionnelle, Montpellier  
(Rapporteur)

**Madame Sophie CHAUVET**

Professeur, Institut de Biologie du Développement de Marseille, Luminy  
(Examineur)

**Monsieur Xavier NICOL**

Directeur de Recherche, Institut de la Vision, Paris  
(Rapporteur)

**Monsieur Rémy SADOUL**

Professeur, Université Grenoble Alpes, Grenoble  
(Président)







# 1 Remerciements

Je souhaite tout d'abord remercier l'ensemble des membres de mon jury, **Sophie Chauvet, Fabrice Ango, Xavier Nicol et Rémy Sadoul**, pour avoir accepté d'évaluer mes travaux. Je remercie plus particulièrement **Fabrice Ango** et **Xavier Nicol** pour leurs évaluations de mon manuscrit, **Sophie Chauvet** mais aussi **Homaira Nawabi** et **Yves Goldberg** pour leurs suivis annuels de l'avancé de mon projet durant les CST, et enfin **Rémy Sadoul** pour avoir présidé ma soutenance bien sûr mais aussi pour sa participation à mon éducation scientifique en tant que responsable de ma formation aux neurosciences durant mes années de faculté (bon ok aussi pour sa compagnie durant les **ThanksGotItsFriday**).

Je remercie ensuite l'ensemble des membres de l'équipe, **Annie, Carlotta, Céline, Christian, Christophe, Eric, Fred, Jacques, Jean-Christophe, Jean-Marc, Lety, Marie-Jo, Sylvie, Yves**. Voilà quatre ans maintenant que je suis arrivé dans cette "petite famille" au sein de laquelle vous réservez toujours une chaleureuse place pour les nouveaux "enfants" recrutés. Ca aura été un réel plaisir de partager avec vous le quotidien du labo, les discussions scientifiques, les pauses café, les croissants qui vont avec, les chocolats du jeudi, les bières du vendredi, les discussions du vendredi, et les blagues qui vont avec, les sorties ski ou via ferrata, les paris sportifs underground, les restos, les bonnes choses ramenées de voyages, les moins bonnes aussi, les soirées intergénérationnelles que ce soit pour Noël ou Thanksgiving, pour d'autres raisons, ou sans raison... Bref je ne souhaite qu'avoir de nouvelles occasions de vivre de nouveau de tels moments avec vous à Grenoble dans un futur proche forcément et plus lointain je l'espère!

Il faut que j'insiste en remerciant de nouveau **Annie** pour m'avoir intégré dans son équipe et soutenu lors de ma décision de réaliser cette thèse et tout au long de celle-ci. Je remercie du fond du cœur **Jean-Christophe** (Toff) et **Sylvie** (surnommée à tort Herr Général, mea culpa), mes directeur et directrice de thèse, pour absolument tout ce que vous m'avez fait "subir"! Je n'ai jamais vu de chercheurs qui encadrent mieux que vous, avec autant de passion, de patience, et surtout de disponibilité! De vrais parents, et ce n'est pas moi qui le dit puisque c'est comme ça que vous vous êtes fait appeler par le jury pendant ma soutenance!

Pour faire court, si miraculeusement un étudiant lit un jour ceci avant de postuler dans l'équipe Andrieux, je n'ai qu'une chose à lui dire : "Demande à bosser avec Toff et Sylvie!". Donc encore MERCI à vous deux, puisque c'est grandement grâce à vous que ma première expérience professionnelle a été aussi plaisante/enrichissante et que j'ai maintenant l'envie de continuer dans ce domaine.

De nouveau merci à **Eric** et **Jacques**, mes deux interlocuteurs qui m'ont été les plus utiles pour mes analyses d'images et statistiques et qui ont grandement participé à me donner le goût au moins de l'analyse d'image (Jacques tu as le mérite des jeux de société faute des stats ;)! Et de nouveau merci à **Christian** et **Christophe**, qui reviennent de loin vu mes connaissances en bioch mais à qui je dois d'autant plus pour leur précieuse aide du fait de mon manque de passion pour cette matière qui a pourtant été si indispensable à l'évolution de ce projet! (avoue Sylvie que tu aurais bien voulu me dire que "toi tu n'aurais pas formulé cette phrase de cette façon" :p)

Je remercie bien évidemment les étudiants que j'ai eu la chance de rencontrer au GIN, je pense tout d'abord à **Chrystelle** avec qui j'ai fait à la fois le plus de début de soirée et de fermeture de bar durant cette thèse et avec qui j'ai eu le plaisir d'avoir de si enrichissantes discussions dont ni l'un ni l'autre nous nous souvenons. J'en profite pour t'attribuer la palme du commérage même si tu triches un peu en étant trop souvent partie intégrante de tes propres potins! J'espère que nous aurons encore de nombreuses occasions de nous voir durant les années à venir. Je remercie aussi **Julie**, seconde thésarde à avoir partagé le quotidien de l'équipe avec moi ainsi que **Charlotte**, la dernière recrue qui, malheureusement pour elle, a du supporter de travailler avec moi avant d'obtenir sa place tant convoitée de thésarde (si le traumatisme persiste n'oublie pas que c'est Toff ton vrai encadrant). Bon courage pour la poursuite du projet CRMP4 que tu mèneras au plus loin j'en suis sûr. Ce manuscrit est déjà trop long pour que je fasse plus que seulement citer les autres étudiants, Alexis, Marine, Charlotte, Vincent, Julie-Anne, Célia, Anne-Cé, Brice, Murielle, Joseph, Amandine, Ulysse, Thibault, Ivy, Pierre, Max, Guillaume (et j'en passe parce que même juste la liste serait trop longue...) avec qui j'ai eu l'occasion de partager des infos, des verres, des congrès, et d'incontournables frustrations scientifiques.

Je remercie enfin tous mes amis de plus longue date, les infirmiers, les mauriennais, les barraulains et tous les autres, et je m'excuse d'en avoir délaissé certains durant cette thèse (et oué il faut avouer que je n'ai pas eu autant de temps à vous consacrer que durant la faculté ou avant!). Merci tout particulièrement à **Audrey**, ne serait-ce que pour avoir eu l'heureuse idée de me mettre en contact avec Toff, mais aussi pour tout ce temps passé ensemble à jouer aux jeux vidéo, faire la fête, voyager, manger, dormir même!, et aussi pour le peu de temps qu'il nous est resté dans tout ça pour travailler nos exams. Je dois bien une mention spéciale à mon **Justin**, colocataire et amis d'enfance envers et contre tout, je ne donnerai pas plus de détails histoire de laisser un poil de crédibilité à la suite de ce manuscrit mais toi tu sais ce qu'il en est ;-)

Enfin je remercie l'ensemble de ma famille! Bien évidemment je remercie ma **Maman** sans qui je ne serais évidemment pas là, mais aussi sans qui mon manuscrit aurait été bourré de fautes (j'en ai laissé dans les remerciements histoire qu'une partie au moins soit 100% de moi!). Merci maman d'avoir veillé à ce que je fasse quelque chose de mon intérêt pour la biologie. Merci de m'avoir demandé tous les jours en rentrant de l'école si j'avais eu des notes! Je t'ai détesté pour ça mais maintenant je finis par me rendre compte de l'utilité de cette surveillance quotidienne d'un étudiant dans mon genre! C'est quand même avec joie que je t'annonce que tout ça se termine aujourd'hui avec ce dernier examen! Merci ensuite à mon parrain **Jean-Jacques** et sa femme **Françoise**, ainsi qu'à mon oncle et ma tante **Jean-Marc** et **Aurélié** d'avoir fait un si long chemin pour venir me soutenir durant la soutenance! Je ne méritais pas autant d'efforts de votre part quand on voit la fréquence à laquelle je prends de vos nouvelles mais cela m'a vraiment touché (il faudra que je vous envoie le manuscrit que vous puissiez au moins lire ça...).

Enfin je remercie toute personne qui lira ce manuscrit pour l'intérêt qu'il portera peut-être à mon travail.

# 1 Abréviations

**aa** : acide aminé

**ADAM10** : A Disintegrin And Metalloprotease 10

**ADN** : Acide DésoxyriboNucléique

**ADNc** : Acide DésoxyriboNucléique complémentaire

**Adnp** : Activity-dependent neuroprotective protein

**Akt** : Protein Kinase B

**APC** : Adenomatous polyposis coli

**ARN** : Acide RiboNucléique

**ARNm** : Acide RiboNucléique messenger

**ARP** : Actin-Related Proteins

**BDNF** : Brain Derived Neurotrophic Factor

**BMCC1** : Bcl2, the adenovirus E1B 19 kDa interacting protein 2 and the Cdc42 GAP homology BCH motif-containing molecule at the carboxy-terminal region 1

**BMP** : Bone Morphogenic Protein

**CA1/3** : Cornu Ammonis 1/3

**CAM** : Cell Adhesion Molecule

**CaMKII** : Ca<sup>2+</sup>/calmoduline dependent kinase II

**cAMP** : cyclic Adenosine Mono-Phosphate

**CDC42** : Cell division control protein 42 homolog

**Cdk5** : Cyclin-dependent kinase 5

**cGMP** : cyclic Guanosine Mono-Phosphate

**CLASP** : Cytoplasmic linker associated protein 1

**CRMP** : Collapsin Response Mediator Protein

**CSPGs** : Chondroitin Sulfate Proteoglycans

**CXCL12** : C-X-C motif chemokine 12

**Dab1** : Disabled-1

**DAT** : Dopamine Active Transporter

**DCC** : Deleted in Colorectal Carcinomas

**DHHC** : aspartate-histidine-histidine-cystein

**DHPase** : dihydropyrimidinase

**DRG** : Dorsal Root Ganglia

**DsCAM** : Down syndrome Cell Adhesion Molecule

**DTI** : Diffusion Tensor Imaging

**DYRK2** : Dual Tyrosine-Regulated Kinase 2

**EB1** : Microtubule-associated protein RP/EB family member 1

**Eps15** : Epidermal growth factor receptor substrate 15

**FA** : Fraction d'Anisotropie

**Fes** : FES proto-oncogene, tyrosine kinase

**Fyn** : Proto-oncogene tyrosine-protein kinase Fyn

**Fz** : Frizzled

**GAP** : GTPases-Activating Proteins

**GEF** : Guanine Exchange Factors

**GFP** : Green Fluorescent Protein

**GIPC1** : GIPC PDZ domain containing family, member 1

**GM130** : Golgi Matrix protein 130

**GPI** : Glycosyl-Phosphatidyl-Inositol

**GSK3 $\beta$**  : Glycogen Synthase Kinase 3 $\beta$

**HEK** : Human embryonic kidney

**HPA** : Hypothalamo-Pituitary Axis

**IRM** : Imagerie par Résonance Magnétique

**ITSN1** : Intersectin 1

**kD** : kilo Dalton

**KD** : Knock Down

**KI** : Knock In

**KLC1** : Kinesin Light Chain 1

**KO** : Knock Out

**LTDP** : Long Term Depression

**LTP** : Long Term Potentiation

**MAG** : *Myelin*-Associated Glycoprotein

**MAI** : Myelin Associated Inhibitor

**MAP** : Microtubule Associated Protein

**MAP6d1** : MAP6 domain-containing protein 1

**mcht** : medial cortico-hypothalamic tract

**MEMRI** : Manganese-Enhanced Magnetic Resonance Imaging

**MLC** : Myosin Light Channel

**MM** : corps mamillaires

**Mtl** : MIG-2-like

**mtt ou mt** : Mammillo-Thalamic Tract

**NaV** : Voltage-gated sodium channel

**Nedd4-2** : Neural precursor cell expressed developmentally down-regulated protein 4-2

**NGF** : Nerve Growth Factor

**NgR** : Nogo Receptor

**NLS** : Nuclear Localisation Sequence

**NMDA** : N-methyl-D-aspartate

**Nrp** : Neuropiline

**OMgp** : Oligodendrocyte *Myelin* Glycoprotein

**OTK** : Offtrack

**pb** : paires de bases

**PC12** : pheochromocytoma 12

**pl** : point iso-électrique

**PI3K** : PhosphoInositide 3 kinase

**Pitch** : Protein Patched Homolog 1

**Plx** : Plexin

**PTP** : post-tetanic potentiation

**Rac** : Ras-related C3 botulinum toxin substrate

**RhoA** : Ras homolog gene family member A

**Rln** : Reelin

**RMS** : Rostral Migratory Stream

**Robo** : Roundabout

**ROCK2** : Rho-associated kinase 2

**Sema** : Semaphorin

**Shh** : Sonic hedgehog

**SH3** : Src Homology 3

**Slp1** : Secretory leukocyte protease inhibitor

**SL21** : STOP-like protein 21 kD

**Sra1** : Specifically Rac1-associated protein 1

**SV2** : Synaptic Vesicle protein 2

**+TIPs** : positive end-Tracking Protein

**TMEM106B** : Transmembrane protein 106B

**TrkB** : Tyrosine Receptor Kinase B

**TOAD-64** : Turn On After Division - 64kD

**UNC** : Uncoordinated phenotype

**VEGFR2** : Vascular Endothelial Growth Factor Receptor 2

**WASP** : Wiskott-Aldrich syndrome family protein

**WAVE** : WASP-family verprolin-homologous protein

**WT** : Wild Type

**Yes** : Proto-oncogene tyrosine-protein kinase Yes

**3T3** : 3-day transfer, inoculum  $3 \times 10^5$  cells



# Sommaire

|            |   |           |
|------------|---|-----------|
| <b>1</b>   | <b>REMERCIEMENTS</b>  | <b>3</b>  |
| <b>1</b>   | <b>ABRÉVIATIONS</b>   | <b>6</b>  |
| <b>2</b>   | <b>VUE D'ENSEMBLE DE MON PROJET DE THESE.</b>   | <b>14</b> |
| <b>3</b>   | <b>LE GUIDAGE AXONAL</b>  | <b>18</b> |
| <b>3.1</b> | <b>NEURO-DEVELOPPEMENT, LES GRANDES LIGNES</b>  | <b>18</b> |
| <b>3.2</b> | <b>LES GRANDES FAMILLES DE MOLECULES GUIDANT LA CROISSANCE AXONALE</b>  | <b>19</b> |
| 3.2.1      | MOLECULES DE GUIDAGE "CANONIQUES"   | 19        |
| 3.2.2      | MOLECULES D'ADHERENCE CELLULAIRE (CAM)  | 24        |
| 3.2.3      | AUTRES MOLECULES DE GUIDAGE   | 25        |
| <b>3.3</b> | <b>DIVERSITE DES REPONSES AUX MOLECULES DE GUIDAGE ET LEUR MODULATION</b>   | <b>26</b> |
| 3.3.1      | REPONSE TRANSITOIRE OU "SWITCHING RESPONSES".   | 26        |
| 3.3.2      | COMBINATOIRE  | 29        |
| <b>4</b>   | <b>BASES MOLECULAIRES DE LA MOTILITE DU CONE DE CROISSANCE</b>  | <b>32</b> |
| <b>4.1</b> | <b>RENCONTRE ENTRE CONE DE CROISSANCE ET UN LIGAND ATTRACTIF.</b>   | <b>32</b> |
| <b>4.2</b> | <b>PRECISIONS SUR L'EQUILIBRE DYNAMIQUE DE L'ACTINE-F AU SEIN DU DOMAINE PERIPHERIQUE, OU PHENOMENE DE "TAPIS ROULANT".</b> | <b>34</b> |
| <b>4.3</b> | <b>MODULATION DE LA DYNAMIQUE DE L'ACTINE</b>   | <b>35</b> |
| <b>4.4</b> | <b>IMPORTANCE DES MICROTUBULES</b>  | <b>37</b> |
| <b>4.5</b> | <b>REGULATION DE LA DYNAMIQUE DES MICROTUBULES</b>  | <b>38</b> |
| <b>5</b>   | <b>PRECISIONS SUR LA SEMAPHORINE 3E</b>   | <b>39</b> |
| <b>5.1</b> | <b>MECANISMES D'ACTION DE LA SEMA3E</b>   | <b>39</b> |
| 5.1.1      | ATTRACTION VERSUS REPULSION   | 39        |
| 5.1.2      | VASCULARISATION   | 42        |
| <b>6</b>   | <b>PRECISIONS SUR LE FORNIX</b>   | <b>43</b> |
| <b>6.1</b> | <b>UN EXEMPLE DE L'IMPLICATION DE LA SEMA3E DANS LA FORMATION DE CONNECTIONS INTERNEURONALES: LE FORNIX</b>                 | <b>43</b> |
| 6.1.1      | NEURO-ANATOMIE ET CONNECTIVITE  | 43        |
| 6.1.2      | GUIDAGE AXONAL DU FORNIX  | 45        |
| 6.1.3      | FONCTION  | 46        |
| 6.1.4      | MEMOIRE   | 47        |
| 6.1.5      | STRESS  | 48        |

|            |   |           |
|------------|---|-----------|
| 6.1.6      | MOTIVATION ET RECOMPENSE  | 48        |
| <b>7</b>   | <b>MAP6</b>   | <b>49</b> |
| <b>7.1</b> | <b>BREF HISTORIQUE</b>  | <b>49</b> |
| <b>7.2</b> | <b>LA FAMILLE MAP6</b>  | <b>50</b> |
| 7.2.1      | LES DIFFERENTES ISOFORMES DE MAP6   | 50        |
| 7.2.2      | LOCALISATION TISSULAIRE ET SUBCELLULAIRE DES DIFFERENTES ISOFORMES.                                 | 53        |
| <b>7.3</b> | <b>CARACTERISATION DES DOMAINES FONCTIONNELS DE MAP6</b>  | <b>54</b> |
| 7.3.1      | LA LIAISON AUX MICROTUBULES PAR LES DOMAINES MN ET MC   | 55        |
| 7.3.2      | REGULATION DE L'ACTIVITE DE MAP6 SUR LE CYTOSQUELETTE PAR LA LIAISON A LA CALMODULINE.              | 56        |
| 7.3.3      | REGULATION DE L'INTERACTION DE MAP6 AVEC LE CYTOSQUELETTE LORS DE SA PHOSPHORYLATION PAR LA CAMKII. | 57        |
| 7.3.4      | INTRODUCTION DE SL21 ET ADRESSAGE DE MAP6 AU GOLGI PAR SES DOMAINES DE PALMITOYLATION.              | 58        |
| 7.3.5      | ROLE DES DOMAINES RICHES EN PROLINE DANS L'INTERACTION DE MAP6 AVEC D'AUTRES PROTEINES.             | 60        |
| 7.3.6      | AUTRES INTERACTIONS FONCTIONNELLES CONNUES DE MAP6  | 60        |
| <b>7.4</b> | <b>LA SOURIS KO MAP6</b>  | <b>61</b> |
| 7.4.1      | GENERATION DE LA SOURIS KO MAP6 ET FOND GENETIQUE   | 61        |
| 7.4.2      | IMPLICATIONS DE MAP6 SUR LA NEURO-ANATOMIE DES SOURIS   | 62        |
| 7.4.3      | IMPLICATIONS DE MAP6 SUR LA PHYSIOLOGIE DES CELLULES NEURONALES                                     | 62        |
| 7.4.4      | LE COMPORTEMENT DES SOURIS KO MAP6  | 64        |
| 7.4.5      | EFFETS DES ANTIPSYCHOTIQUES CHEZ LA SOURIS KO MAP6  | 65        |
| 7.4.6      | EFFETS DE L'EPOTHILONE D CHEZ LA SOURIS KO MAP6   | 66        |
| 7.4.7      | LES SOURIS KO MAP6, UN MODELE D'ETUDE DE PATHOLOGIES PSYCHIATRIQUES RECONNU                         | 67        |
| <b>8</b>   | <b>LES CRMPS</b>  | <b>69</b> |
| <b>8.1</b> | <b>HISTORIQUE</b>   | <b>69</b> |
| <b>8.2</b> | <b>STRUCTURE ET DIVERSITE DES CRMP</b>  | <b>70</b> |
| 8.2.1      | HOMOLOGIE DE SEQUENCE   | 70        |
| 8.2.2      | L'EPISSAGE ALTERNATIF DES CRMPS   | 71        |
| 8.2.3      | EXPRESSION TISSULAIRE   | 72        |
| 8.2.4      | MODIFICATION POST-TRADUCTIONNELLES DES CRMPS  | 73        |
| 8.2.5      | OLIGOMERISATION   | 75        |
| <b>8.3</b> | <b>FONCTIONS CELLULAIRES DES CRMP</b>   | <b>78</b> |
| 8.3.1      | MODULATION DU CYTOSQUELETTE   | 78        |
| 8.3.2      | TRANSPORT AXONAL ET VESICULES   | 81        |
| 8.3.3      | CROISSANCE NEURITIQUE   | 82        |
| 8.3.4      | REGENERATION AXONALE  | 85        |
| 8.3.5      | REGULATION DES COURANTS IONIQUES  | 88        |
| 8.3.6      | APOPTOSE  | 89        |
| 8.3.7      | MIGRATION CELLULAIRE  | 90        |
| <b>8.4</b> | <b>LES SOURIS KO CRMP</b>   | <b>91</b> |
| <b>8.5</b> | <b>LES CRMP ET LES MALADIES PSYCHIATRIQUES</b>  | <b>93</b> |

|              |   |            |
|--------------|---|------------|
| <b>9</b>     | <b>OBJECTIF DE MA THESE :</b>   | <b>95</b>  |
| <b>10</b>    | <b>RESULTATS</b>  | <b>97</b>  |
| <b>10.1</b>  | <b>RESUME DE L'ARTICLE " MICROTUBULE-ASSOCIATED PROTEIN 6 MEDIATES NEURONAL CONNECTIVITY THROUGH SEMAPHORIN 3E-DEPENDENT SIGNALING FOR AXONAL GROWTH. "</b> | <b>97</b>  |
| <b>10.2</b>  | <b>ARTICLE 1 : " MICROTUBULE-ASSOCIATED PROTEIN 6 MEDIATES NEURONAL CONNECTIVITY THROUGH SEMAPHORIN 3E-DEPENDENT SIGNALING FOR AXONAL GROWTH. "</b>         | <b>98</b>  |
| <b>10.4</b>  | <b>RESUME DE L'ARTICLE "CHARACTERIZATION OF CRMP4 AS A PARTNER OF THE MAP6 PROTEIN IN THE SEMAPHORIN-3E SIGNALING PATHWAY."</b>                             | <b>123</b> |
| <b>10.5</b>  | <b>ARTICLE 2 : "CHARACTERIZATION OF CRMP4 AS A PARTNER OF THE MAP6 PROTEIN IN THE SEMAPHORIN-3E SIGNALING PATHWAY."</b>                                     | <b>124</b> |
| <b>10.6</b>  | <b>RÉSUMÉ DE L'ARTICLE "3D IMAGING OF THE BRAIN MORPHOLOGY AND CONNECTIVITY DEFECTS IN A MODEL OF PSYCHIATRIC DISORDERS: MAP6-KO MICE"</b>                  | <b>157</b> |
| <b>10.7</b>  | <b>ARTICLE 3 : "3D IMAGING OF THE BRAIN MORPHOLOGY AND CONNECTIVITY DEFECTS IN A MODEL OF PSYCHIATRIC DISORDERS: MAP6-KO MICE"</b>                          | <b>160</b> |
| <b>10.8</b>  | <b>RESULTAT PRELIMINAIRE EN LIEN AVEC L'ARTICLE DE GIMENEZ ET AL.</b>   | <b>173</b> |
| 10.8.1       | PHENOPIE DU DEFAT DU FAISCEAU PYRAMIDAL CHEZ LES SOURIS KO CRMP4.   | 173        |
| <b>10.9</b>  | <b>RESUME DE L'ARTICLE "VASOHIBINS/SVBP ARE TUBULIN CARBOXYPEPTIDASES (TCP) THAT REGULATE NEURON DIFFERENTIATION"</b>                                       | <b>174</b> |
| <b>10.10</b> | <b>ARTICLE 4 : "VASOHIBINS/SVBP ARE TUBULIN CARBOXYPEPTIDASES (TCP) THAT REGULATE NEURON DIFFERENTIATION"</b>   | <b>177</b> |
| <b>11</b>    | <b>DISCUSSION ET PERSPECTIVES</b>   | <b>199</b> |
| <b>11.1</b>  | <b>ROLE DE MAP6 ET CRMP4 DANS LA SIGNALISATION SEMA3E</b>   | <b>200</b> |
| 11.1.1       | INTERACTION AVEC COMPLEXE TRIPARTITE  | 200        |
| 11.1.2       | DOMAINES FONCTIONNELS DE MAP6 ET CRMP4 DANS LA SIGNALISATION SEMA3E   | 202        |
| 11.1.3       | SPECIFICITES D'ACTION DANS LA VOIE DE SIGNALISATION ATTRACTIVE DE LA SEMA3E?  | 205        |
| <b>11.2</b>  | <b>PHENOPIES ET DIFFERENCES ENTRE LES LIGNEES DE SOURIS MAP6, SEMA3E ET CRMP4 KO.</b>   | <b>207</b> |
| 11.2.1       | MAP6 EST-ELLE UNIQUEMENT NECESSAIRE A LA SIGNALISATION SEMA3E?  | 207        |
| 11.2.2       | L'IMPLICATION DE CRMP4 DANS D'AUTRES SIGNALISATIONS QUE LA SEMA3E PEUT-ELLE EXPLIQUER LES PHENOTYPES NEURO-ANATOMIQUES DES SOURIS KO CRMP4?                 | 208        |
| 11.2.3       | QUELLES SONT LES CONSEQUENCES COMPORTEMENTALES DE L'ALTERATION DU FORNIX?   | 209        |
| <b>11.3</b>  | <b>IRM</b>  | <b>211</b> |
| 11.3.1       | LIMITES ET COMPLEMENTARITE AVEC L'HISTOLOGIE.   | 211        |
| <b>11.4</b>  | <b>QUANTIFICATION AUTOMATIQUE DE L'ARBORISATION DE NEURONES EN CULTURES PAR LA MACRO AUTOEURITEJ.</b>   | <b>212</b> |
| 11.4.1       | PROBLEMATIQUE D'ANALYSE MORPHOLOGIQUE DE NEURONES EN CULTURE.   | 212        |
| 11.4.2       | AVANTAGES ET INCONVENIENTS D'AUTOEURITEJ  | 213        |
| 11.4.3       | AMELIORATIONS A APPORTER  | 214        |
| <b>12</b>    | <b>CONCLUSION GENERALE</b>  | <b>215</b> |

|             |   |            |
|-------------|---|------------|
| <b>13</b>   | <b>ANNEXE</b>   | <b>216</b> |
| <b>13.1</b> | <b>MACRO AUTO NEURITEJ</b>  | <b>216</b> |
| 13.1.1      | PARTIE 1 : CREATION DES IMAGES INDIVIDUELLES DES NEURONES ET DE LEUR SQUELETTE AVANT LEUR QUANTIFICATION. | 216        |
| 13.1.2      | PARTIE 2 : QUANTIFICATION DES PARAMETRES MORPHOMETRIQUES DES NEURONES.                                    | 221        |
| <b>14</b>   | <b>REFERENCES</b>   | <b>228</b> |

## 2 Vue d'ensemble de mon projet de thèse.

Le cerveau est le siège de la perception, de la cognition et du contrôle du mouvement. Ces fonctions sont déterminées par le réseau de connexions entre les milliards de neurones qui le composent. Tout dysfonctionnement dans l'établissement de ces connexions et dans leur intégrité peut entraîner des maladies neurologiques ou psychiatriques. Le guidage axonal nécessaire à la précision de la mise en place de ce réseau est assuré par une grande variété de protéines signalisatrices mais aussi de protéines transductrices de ce signal qui vont *in fine* promouvoir ou au contraire inhiber la croissance axonale dans une direction donnée. Un des challenges de l'étude de ces mécanismes est d'identifier les spécificités de ces protéines au sein de cette multitude de voies de signalisations possibles.

L'équipe d'Annie Andrieux, dans laquelle j'ai réalisé ma thèse, étudie les protéines MAP6. Celles-ci ont été initialement décrites comme des protéines associées aux microtubules responsables de la stabilité des microtubules au froid. Les souris déficientes en protéines MAP6 sont viables mais présentent, entre autre, des troubles cognitifs et comportementaux. Il a été montré que certains de ces phénotypes ne sont pas sans rappeler les symptômes observés chez les patients atteints de schizophrénie. Certains des troubles comportementaux et biologiques des souris MAP6-KO sont par ailleurs corrigés par l'administration de neuroleptiques, traitement classique de cette pathologie. Récemment un lien entre les défauts comportementaux de ces souris et des défauts de connectivité cérébrale a été mis en évidence. En effet, les cerveaux MAP6-KO présentent un déficit axonal se traduisant par une hypoplasie de nombreux faisceaux neuronaux tels que le fornix. Ce faisceau de neurones appartient au système limbique contrôlant la mémoire et les émotions et son absence peut directement être reliée à certains troubles comportementaux observés chez les souris KO MAP6. L'étude plus approfondie des causes de l'absence du fornix chez ces souris, a permis de mettre en évidence l'implication de MAP6 dans la voie de signalisation induite par la molécule de guidage sémaphorine 3E (Sema3E). Contre toute attente, la délétion des domaines de MAP6 contrôlant ses interactions avec les microtubules et l'actine n'altère pas la réponse à la Sema3E.

L'objectif de ma thèse a été de mieux comprendre le rôle de MAP6 dans le guidage axonal et en particulier dans la signalisation dépendante de la Sema3E. J'ai tout d'abord participé à la poursuite de la caractérisation des défauts neuro-anatomiques des souris KO MAP6. Dans ce projet nous nous sommes servis d'acquisitions DTI de haute résolution afin de compléter l'identification des altérations de connectivités neuronales des cerveaux de ces souris. J'ai contribué à la validation et à l'approfondissement de la compréhension de ces altérations à travers une étude comparative entre les données DTI et celles que j'ai obtenues par des techniques classiques d'histologie ou de transparisation de cerveaux.

Dans un second temps, notre laboratoire a cherché à identifier les partenaires de MAP6 en utilisant une colonne d'affinité associée à une analyse en spectrométrie de masse. Parmi ces partenaires, 3 protéines CRMP (Collapsin Response Mediator Protein), CRMP1, 2 et 4, ont particulièrement retenu notre attention. En effet, cette famille de protéines a déjà été décrite dans la régulation de la croissance axonale et ces trois isoformes (CRMP1, 2 et 4) ont été impliquées dans la signalisation dépendante de la sémaphorine 3A. J'ai examiné l'effet de l'inhibition des CRMP 1, 2 et 4 sur la signalisation Sema3E dans des neurones du subiculum en utilisant des siRNA spécifiques pour chaque CRMP. J'ai démontré que seule l'inhibition de CRMP4 abolit la stimulation de la croissance axonale des neurones du subiculum par la Sema3E. L'utilisation des souris CRMP4-KO m'a permis de vérifier que les neurones CRMP4-KO du subiculum étaient eux aussi insensibles à la Sema3E. J'ai ensuite entrepris une étude du fornix chez ces souris et montré que l'absence de CRMP4 s'accompagne d'un retard de croissance et d'une forte diminution du volume de ce faisceau. Finalement, les croisements des lignées de souris CRMP4 avec les lignées Sema3E ou MAP6 ont permis de révéler l'existence d'une coopération entre ces différentes protéines. L'ensemble de mes résultats met en évidence l'implication de CRMP4 dans la mise en place du fornix dépendante de la voie de signalisation Sema3E, et suggère fortement une coopération entre CRMP4 et MAP6 dans cette voie de signalisation. J'ai débuté en parallèle une étude biochimique pour mieux caractériser les interactions entre MAP6 et CRMP4. J'ai ainsi pu identifier deux domaines, dans la région N terminale de MAP6, nécessaire à son interaction avec CRMP4.

Enfin durant ma thèse j'ai participé à l'amélioration de techniques d'imageries (mise au point de techniques de transparisation de tissus au sein du laboratoire) mais aussi d'analyse d'image. Dans ce domaine j'ai rédigé, conjointement avec un collègue du laboratoire, une macro sur le logiciel ImageJ permettant la quantification automatique de différents paramètres morphométriques de cultures primaires de neurones.

# Introduction



## 3 Le guidage axonal

### 3.1 Neuro-développement, les grandes lignes

Très tôt pendant le développement embryonnaire, la mise en place des feuillettes embryonnaires (ectoderme, mésoderme, endoderme) par la gastrulation, va aboutir à leur différenciation. Ce mécanisme va conduire à la production des différents types de progéniteurs cellulaires. Ainsi l'ectoderme va former, entre autres, le tube neural à l'origine du système nerveux central et de la plus grande partie du système nerveux périphérique. La mise en place de ce système nerveux passe par la neurogénèse, qui va se dérouler en plusieurs étapes. Ces étapes vont se succéder ou partiellement se chevaucher à l'échelle d'un neurone isolé mais sont concomitantes à l'échelle du cerveau dans son ensemble :

Tout d'abord une phase de prolifération, où pratiquement la totalité des futurs neurones, appelés neuroblastes, vont être produits à partir des cellules du tube neural.

Puis une phase de migration/différenciation, au cours de laquelle les neuroblastes vont migrer de leur lieu de production vers leurs localisations finales. Parallèlement à cette migration, les neuroblastes vont commencer à acquérir leur spécificité, par différenciation, en fonction du nouvel environnement qu'ils rencontrent.

Une fois leur positionnement effectué, les neurones en développement commencent la phase d'axonogenèse. C'est une phase tardive du développement embryonnaire, qui va se poursuivre après la naissance. C'est durant cette troisième phase que les prolongements axonaux, vont croître dans des directions bien précises pour permettre l'établissement des futures connections inter-neurales. Cette croissance est dirigée, tout d'abord, par la présence de molécules de guidage. Elles vont être exprimées, soit à la surface membranaire des cellules environnant le passage emprunté par l'axone, soit directement sécrétées dans le milieu extracellulaire où elles vont diffuser. Des molécules d'adhérence cellulaire ainsi que des molécules de la matrice extracellulaire vont aussi participer à ce guidage axonal (Tessier-Lavigne and Goodman, 1996). Le cône de croissance, situé à l'extrémité distale de l'axone, a une fonction de senseur de l'environnement. En fonction de sa sensibilité pour telle ou telle molécule de guidage, il va orienter la croissance axonale selon deux grands mécanismes. Il va être soit attiré par ces molécules et donc croître dans leur direction ou à l'inverse être repoussé par celles-ci et se rétracter (on parle alors de collapse) (Figure 1).

Cette sensibilité va dépendre en grande partie de la composition en récepteurs exprimés à la surface du cône de croissance, mais aussi de la composition et de la régulation des effecteurs intracellulaires exprimés par le neurone en croissance (chapitre 3.2).

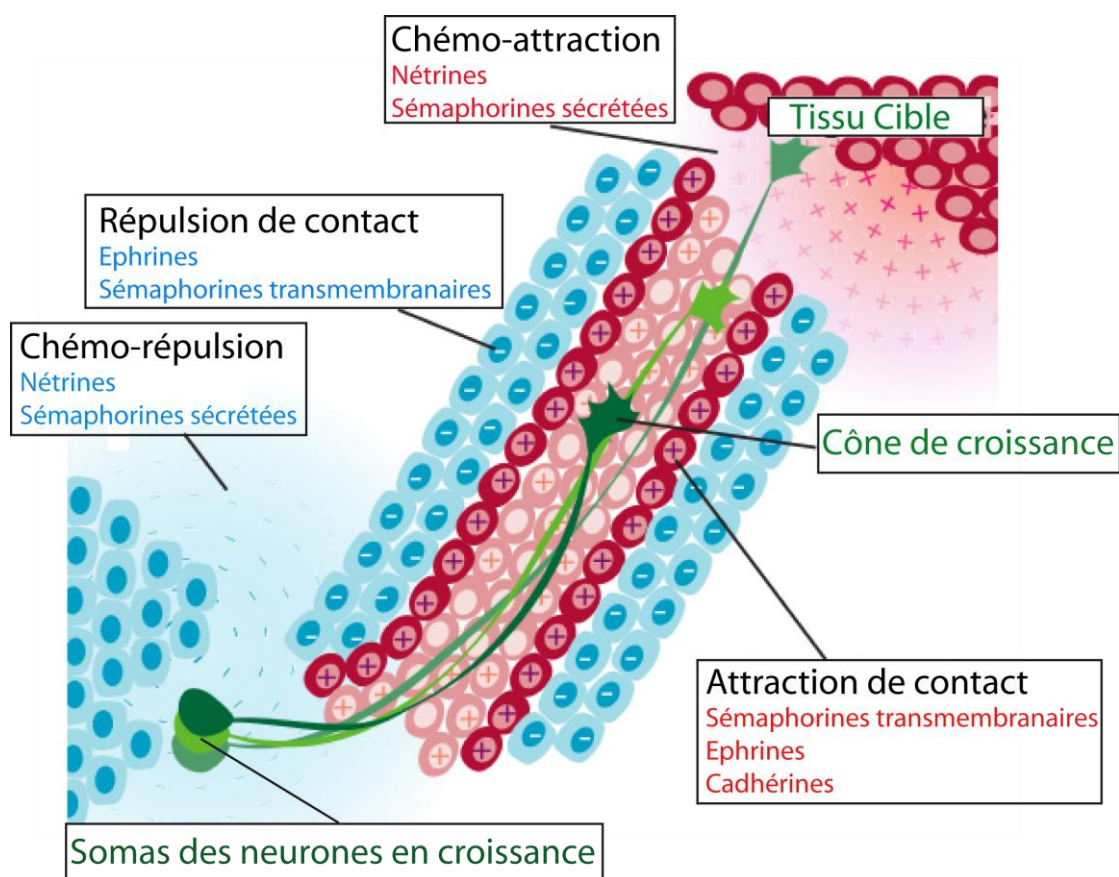
La dernière étape est la synaptogenèse, au cours de laquelle les connections neuronales vont devenir fonctionnelles et permettre la survie des neurones actifs. En effet la surproduction de neurones durant le développement embryonnaire conduit à une phase finale d'élagage (ou "pruning" en anglais), durant laquelle les connections neuronales inactives, non nécessaires aux fonctions cérébrales, vont dégénérer et conduire à l'apoptose des neurones inutilisés tandis que les neurones actifs vont voir leurs connections se stabiliser et se renforcer.

Une des problématiques de l'étude du neuro-développement, est de comprendre les mécanismes permettant un contrôle aussi précis de la mise en place des milliers de connections que chacun des milliards de neurones va établir au cours de l'axonogenèse et de la synaptogenèse.

## 3.2 Les grandes familles de molécules guidant la croissance axonale

### 3.2.1 Molécules de guidage "canoniques"

La caractérisation des molécules de guidage axonal a conduit à l'identification de 4 grandes familles de protéines, chacune fortement conservée phylogénétiquement, ainsi qu'à l'implication de molécules originellement identifiées pour d'autres fonctions cellulaires. Ces molécules vont pouvoir agir à courte distance lorsqu'elles sont exprimées à la surface de la membrane plasmique de cellules environnant le passage de l'axone en croissance (on parle alors d'attraction ou de répulsion de contact), mais aussi à longue distance lorsqu'elles sont sécrétées dans la matrice extracellulaire où elles diffusent (on parle alors de chémo-attraction ou chémo-répulsion). Elles agissent sur le cône de croissance par un ou plusieurs des mécanismes d'attraction ou de répulsion, à courte ou longue distance (Figure 1). Ces molécules de guidage sont donc nombreuses et ont été classifiées en différentes familles au cours de leurs découvertes. La prochaine partie de ce chapitre sera consacrée à une brève description de ces familles.



**Figure 1 : Schéma récapitulatif des quatre types d'effets que peuvent avoir les molécules de guidage axonal.** On retrouve les effets à courte distance (attraction et répulsion de contact) et à plus longue distance (chémo-attraction et chémo-répulsion). Pour chacun des effets, des exemples de familles de molécules de guidage impliquées sont donnés. Adapté de (Van Battum et al., 2015).

### 3.2.1.1 Nétrines et leurs récepteurs DCC et UNC5

Les nétrines sont au nombre de 3 chez les mammifères. Les nétrines-1 et 3, très homologues sont plutôt apparentées à la chaîne  $\gamma$  de la laminine (Koch et al., 2000). La nétrine-4 (ou nétrine- $\beta$ ) a une structure générale similaire aux nétrines-1 et 3 mais présente une plus forte homologie de séquence avec la chaîne  $\beta$  de la laminine.

Les nétrines ont tout d'abord été identifiées chez *C.Elegans*, pour qui le gène *unc-6*, nécessaire au guidage axonal (Hedgecock et al., 1990), encode une nétrine (Ishii et al., 1992). La nétrine-1 a par la suite été identifiée chez les mammifères pour son implication dans le croisement de la ligne médiane du tube neural par les axones de neurones commissuraux (Tessier-Lavigne et al., 1988; Kennedy et al., 1994).

Les nétrines sont bi-fonctionnelles. La présence du récepteur DCC (Deleted in Colorectal Carcinomas) rend les nétrines attractives tandis que la famille de récepteurs UNC5 (A à D chez les mammifères) les rend répulsives (Hong et al., 1999; Keleman and Dickson, 2001).

Un récepteur supplémentaire, nommé néogénine, est lui aussi capable de lier la nétrine conduisant à une réponse attractive du cône de croissance (De Vries and Cooper, 2008).

La génération de souris invalidées pour la nétrine-1 a permis de confirmer cette fonction primordiale des nétrines dans la formation de certaines commissures cérébrales (Serafini et al., 1996). En effet ces souris KO nétrine-1 présentent une forte altération des commissures antérieures, du corps calleux ainsi que de la commissure hippocampale. On retrouve un phénotype similaire chez les souris KO DCC (Fazeli et al., 1997) suggérant un rôle important des fonctions attractives des nétrines dans la formation de ces commissures inter-hémisphériques.

### 3.2.1.2 Slits et leurs récepteurs Robo

Si la propriété chémo-attractive des nétrines sur les neurones commissuraux était connue, sa bi-fonctionnalité n'a été découverte que plus tard. C'est pourquoi les recherches dans le champ ont porté à cette époque sur l'identification des facteurs permettant à ces neurones commissuraux de croiser cette ligne médiane puis de continuer leur croissance contra-latérale sans croiser de nouveau cette frontière. Ainsi le récepteur Robo (Roundabout) (Kidd et al., 1998) et son ligand Slit (Kidd et al., 1999), furent successivement identifiés, chez la drosophile, pour leur effet chémo-répulsif sur les axones commissuraux.

Trois gènes (*Slit1* à *3*) codent pour les protéines Slit et 4 gènes codent pour les différents récepteurs de la famille Robo chez les mammifères. Les protéines Slit sont de grosses protéines d'environ 200 kDa généralement sécrétées mais pouvant parfois être associées à la matrice extracellulaire ainsi qu'aux membranes cellulaires (pour revue voir Blockus and Chédotal, 2016). Certaines Slits sont par ailleurs susceptibles d'être clivées, formant un fragment de 140 kDa, toujours capable de lier les récepteurs Robo (Wang et al., 1999). Les 4 récepteurs transmembranaires Robo, sont structurellement similaires au récepteur DCC et constituent un sous-groupe de la superfamille des Immunoglobulines.

Enfin Slit et Robo sont aussi impliqués dans le contrôle des points de branchement axonaux des neurones sensitifs ainsi que dans la bonne orientation de ces arborisations (Ma and Tessier-Lavigne, 2007).

### 3.2.1.3 Ephrines et leurs récepteurs Eph

Les éphrines sont regroupées en deux sous-familles : 5 éphrines A et 3 éphrines B. Les éphrines A sont localisées à la membrane plasmique par un ancrage lipidique de type GPI (glycosylphosphatidylinositol), tandis que les éphrines B sont des protéines transmembranaires. Ces deux sous-familles de ligands interagissent respectivement avec les récepteurs tyrosines kinases de la famille de Eph A (8 récepteurs) et B (6 récepteurs).

Les éphrines ont été largement étudiées pour leur implication dans l'organisation des projections des cellules ganglionnaires de la rétine dans le cortex visuel (Feldheim and O'Leary, 2010). Ces fonctions organisatrices de la rétinitopie dénotent de la diversité des capacités régulatrices des éphrines. En effet, elles entrent en jeu à la fois dans la régulation de la croissance axonale mais aussi dans la régulation des points de branchements axonaux (Gao et al., 1999; Marler et al., 2008; Joly et al., 2014). Enfin elles ont aussi un effet sur la synaptogenèse et par la suite sur l'élagage (« pruning ») des connections neuronales non fonctionnelles (Gao et al., 1999) (pour revue voir (Shen and Cowan, 2010)).

Enfin la complexité de la signalisation médiée par les éphrines a encore progressé après la découverte de la possibilité d'une signalisation inversée ("reverse signaling") dans laquelle les éphrines transduisent le signal généré par leur liaison aux récepteurs Eph (Cowan and Henkemeyer, 2002; Palmer et al., 2002).

### 3.2.1.4 Sémaphorines et leurs récepteurs pléxines et neuropilines.

Les sémaphorines représentent sans doute la plus grande famille de molécules de guidance (plus d'une vingtaine de membres). Elles sont réparties en 8 classes (Sema1 à 7 et la Sema Virale (V), dont les classes 1, 2 et 5 sont retrouvées uniquement chez les invertébrés (Tableau 1). Elles peuvent être transmembranaires ou sécrétées (dans le cas des classes 2, 3 et V), mais ont toutes pour point commun la présence d'une séquence conservée, d'environ 500 acides aminés, nommée sema domaine. Comme la plupart des autres molécules de guidage les sémaphorines sont bi-fonctionnelles (Kantor et al., 2004; Julien et al., 2005). Ceci peut être permis par les différentes combinaisons possibles de récepteurs/corécepteurs exprimées par les neurones sensibles aux sémaphorines (Chauvet et al., 2007) (Chapitre 5.1.1), mais aussi par les niveaux cytosoliques de GMP cyclique de ces neurones (Nishiyama et al., 2008; Togashi et al., 2008).

Les pléxines (au nombre de 9 chez les vertébrés), réparties en 4 classes (A à D), sont les récepteurs aux sémaphorines nécessaires à la transduction du signal qu'elles apportent. Cependant, un certain nombre de sémaphorines fonctionnent en présence de corécepteurs tels que les neuropilines-1 et 2 (Nrp1 et 2), Cell Adhesion Molecules (L1-CAM, Nr-CAM), VEGFR2, ainsi que les récepteurs tyrosines kinases Offtrack (OTK), ErbB2 et Met (Tableau 1) (Tran et al., 2007). La classe 3 des sémaphorines a la particularité de nécessiter la présence de neuropiline pour être fonctionnelle. En effet, les membres de cette classe se lient directement aux neuropilines (He and Tessier-Lavigne, 1997; Kolodkin et al., 1997), bien que ce soit toujours la pléxine qui transduise le signal (Takahashi et al., 1999). Cette particularité conduit à une classification ambiguë des neuropilines parfois comme récepteur, parfois comme corécepteur.

Les sémaphorines ont été identifiées dans un grand nombre de fonctions cellulaires, non seulement dans la régulation du guidage axonal, mais aussi dans le maintien de la fasciculation des faisceaux neuronaux, dans l'établissement de leurs arborisations ou au contraire dans leur élagage. Elles participent à la régulation de la migration cellulaire et interviennent dans la réponse immunitaire. Enfin il a été identifié que ces sémaphorines sécrétées pouvaient jouer un rôle dans la vascularisation (pour revue voir Tran et al., 2007).

Tout comme pour les éphrines, une signalisation inversée est possible chez les sémaphorines. Elle fut mise en évidence chez la drosophile pour son importance dans la fasciculation axonale, et confirmée par la suite chez les vertébrés pour certains membres des classes 4 et 6 (pour revue voir (Battistini and Tamagnone, 2016).

|             | Sémaphorine | Récepteur  | Corécepteur                            |
|-------------|-------------|--|--|
| Invertébrés | 1A et B     | pléxine-A  | D-OTK                                  |
|             | 2A et B     | pléxine-B  | /                                      |
|             | 5C          | /  | /                                      |
| Vertébrés   | 3A à 3G     | pléxine A1-A4, D1                                    | L1-CAM<br>Nr-CAM<br>neuropiline-1 et 2 |
|             | 6A à 6D     |  | VEGFR2<br>OTK                          |
|             | 4A-G        | pléxine B1-B3<br>CD72 (immunité)<br>Tim-2 (immunité) | ErbB2<br>Met                           |
|             | 5A-B        |  |  |
|             | 7A          | intégrines<br>pléxine-C1                             | /                                      |
| Virus       | V           |  |  |

**Tableau 1 : Classification des Sémaphorines ainsi que des récepteurs et co-récepteurs associés à chacune d'entre elles.**  
Adapté de (Tran et al., 2007).

### 3.2.2 Molécules d'adhérence cellulaire (CAM)

Les molécules d'adhérence cellulaire sont aussi impliquées dans des événements de croissance axonale à travers la modulation d'interactions entre le neurone et la matrice extracellulaire ainsi qu'entre le neurone et les cellules avoisinantes. C'est pourquoi elles ont été des candidates privilégiées pour l'identification d'effecteurs impliqués dans le guidage axonal avant que l'on ne découvre les familles dites "canoniques" présentées précédemment. On retrouve 3 grandes familles de CAM étudiées pour leurs propriétés de guidage: la superfamille des Immunoglobulines (Ig CAM) comprenant la N-CAM, L1-CAM et les Fasciclins, la superfamille des cadhérines et celle des intégrines.

Les premières études avaient montré le rôle important des N-CAM, des intégrines et de la N-cadhérine dans la fasciculation axonale ainsi que dans la croissance axonale. En effet l'incubation de neurones en culture avec des anticorps dirigés contre les CAM provoque une diminution de la vitesse de croissance axonale de ces neurones ainsi qu'une défasciculation des axones (Bixby et al., 1988; Drazba and Lemmon, 1990). Ces phénotypes sont aussi retrouvés *in vivo* (Harrelson and Goodman, 1988; Stoeckli and Landmesser, 1995). Par la suite, l'importance des cadhérines dans l'organisation des projections axonales au niveau du tectum optique a été montrée chez le poulet puis chez la drosophile (Inoue and Sanes, 1997; Nern et al., 2008).

Il faut noter que certaines CAMs et en particulier des membres de la superfamille des immunoglobulines sont en fait des récepteurs ou corécepteurs aux molécules de guidage "canoniques" plutôt que des molécules de guidage en elles-mêmes. En effet, les récepteurs aux nétrines, DCC et UNC5, font partie de la famille des Ig CAMs, et les Nr-CAM et L1-CAM ont été identifiés comme des corécepteurs à la signalisation induite par les sémaphorines de la classe 3 (Castellani et al., 2000; Julien et al., 2005). Cependant, si les interactions hétérophiliques des Ig CAMs (interaction avec d'autres récepteurs/ligands) jouent vraisemblablement un rôle important dans le guidage axonal, cela n'exclut pas un possible rôle des interactions homophiliques (interaction de deux CAM identiques). Ainsi l'utilisation de "micropattern" recouverts de fractions extracellulaires de L1-CAM suffit à induire un guidage axonal de neurones hippocampaux en culture (Oliva et al., 2003). De plus des études chez la drosophile montrent l'importance des interactions homophiliques des DsCAM (Down syndrome Cell Adhesion Molecule) pour la mise en place des connectivités cérébrales.

Près de 20000 isoformes de Dscam peuvent être produites par épissage alternatif, et ceci permet à chacun des neurones de reconnaître ses propres neurites afin d'éviter leur fasciculation et permettre que chaque ramification axonale se connecte correctement (D. Hattori et al., 2007; Wojtowicz et al., 2007). Dans cet exemple l'interaction homophile des DsCAM conduit bien à une répulsion axonale.

### 3.2.3 **Autres molécules de guidage**

D'autres molécules, plus atypiques, ont été identifiées pour leurs effets sur le guidage axonal. La famille des neurotrophines, dont le NGF (nerve growth factor) et le BDNF (brain derived neurotrophic factor), joue un rôle critique dans l'établissement et le maintien du système nerveux. Les récepteurs de ces neurotrophines, tels que TrkA et P75, font partie de la famille des récepteurs tyrosine kinase Trk et vont activer différentes voies de signalisation incluant Ras, RhoA et PI3K/Akt. Ils vont aussi moduler les niveaux de cAMP/cGMP cytosolique jouant un rôle important dans le guidage axonal (voir chapitre 3.3.1) (pour revue Huber et al., 2003).

Les protéines Wnt, Sonic Hedgehog (Shh) et Bones morphogenic protein (BMP), sont des molécules à l'origine identifiées pour leur signalisation canonique conduisant à la modulation de l'expression de gènes responsables de la spécification et différenciation cellulaire. Leurs récepteurs respectifs sont Frizzled (Fz), Pitch1 (Protein patched homolog 1) et les récepteurs BMP I et II (BMPRI, BMPRII). Toutes régulent une signalisation non canonique impliquée dans le guidage axonal (pour revue Yam and Charron, 2013).

Certaines protéines associées à la myéline (MAI), tels que Nogo, MAG ou OMgp ont été tout d'abord identifiées pour leur fonction inhibitrice de la régénération axonale dans le système nerveux central (détails dans le chapitre 8.3.4). Cependant l'expression de ces protéines durant le développement embryonnaire laisse entrevoir une possible fonction physiologique dans le guidage axonal. Tous se lient au récepteur NgR (Nogo receptor).

Enfin, une nouvelle molécule de guidage répulsive nommée draxine a été plus récemment identifiée. Elle est nécessaire à la formation de l'ensemble des commissures du pro-encéphale (Islam et al., 2009), mais est aussi impliquée dans l'établissement de la formation hippocampale (Zhang et al., 2010). Ses récepteurs sont, comme pour les nétrines, DCC ainsi que la néogénine. Cependant il n'y a pas d'homologie de séquence entre draxine et les nétrines.



### 3.3 Diversité des réponses aux molécules de guidage et leur modulation

En plus d'une grande variété de molécules de guidage, ainsi que de récepteurs qui leur sont associés, il existe de multiples mécanismes moléculaires permettant de moduler rapidement les réponses du cône de croissance aux molécules de guidage qu'il rencontre pendant l'axonogenèse.

#### 3.3.1 Réponse transitoire ou "switching responses".

Durant le développement embryonnaire la réponse de certains cônes de croissance nécessite d'être régulée très finement spatialement mais aussi temporellement. Un des mécanismes neuro-développementaux le mieux étudié, illustrant parfaitement cette nécessité, est le croisement de la ligne médiane du tube neural par les neurones commissuraux lors du développement de la moelle épinière. En effet durant ce processus, les projections axonales des neurones commissuraux vont répondre à des signaux attractifs et ignorer les signaux répulsifs en naviguant vers la plaque du plancher pour traverser la ligne médiane (phase attractive). Cependant, une fois ce croisement achevé, ils ne vont plus être attirés par cette ligne médiane mais continuer à croître contra-latéralement à leur corps cellulaire (phase répulsive). L'étude de ce processus a mis en évidence différents mécanismes moléculaires permettant la transition d'une signalisation attractive vers une signalisation répulsive.

La régulation du transport axonal des récepteurs ainsi que de l'adressage de ceux-ci à la membrane du cône de croissance permet de moduler la réponse de l'axone aux molécules de guidage qu'il rencontre. Par exemple, des vésicules cargo enrichies en récepteur Robo1 vont adresser ces derniers à la membrane durant la phase attractive. En revanche, durant la phase répulsive, c'est le transport du récepteur à la signalisation Wnt : Frizzled-3 qui va prendre le relais (Alther et al., 2016) (Figure 2 - A).

L'adressage ainsi que le recyclage des récepteurs vont permettre au neurone de moduler leur composition à la surface du cône de croissance et ainsi d'engendrer la formation de complexes de récepteurs hétérodimériques, permettant une modulation de leurs réponses (détails au chapitre 3.3.2). Par exemple, durant la phase attractive le récepteur DCC va avoir une réponse positive à la nétrine ce qui va attirer le cône au niveau de la ligne médiane.

Cependant une fois au niveau de la plaque du plancher, le cône de croissance va entrer en contact avec Slit, cela va entraîner l'hétérodimérisation de DCC avec Robo. La réponse à la nétrine va alors être inhibée en faveur de la répulsion induite par Slit (Stein and Tessier-Lavigne, 2001). De manière similaire, l'attraction DCC dépendante de la nétrine peut être transformée en répulsion, toujours DCC dépendante, par la dimérisation de ce récepteur avec UNC5 (Hong et al., 1999) (Figure 2-B).

Une signalisation peut aussi être inhibée rapidement par le clivage d'un récepteur (ou du ligand qui lui est associé). Cette coupure peut être extracellulaire, par exemple lorsque le cône de croissance rencontre certaines métalloprotéases présentes dans la matrice extracellulaire. On peut citer le cas de la conversion de l'attraction médiée par l'éphrine-A2 en répulsion par la coupure de celle-ci via la métalloprotéase ADAM10 (A Disintegrin And Metalloprotease 10) (Hattori et al., 2000). Un équivalent intracellulaire de ce mécanisme existe aussi. Par exemple, l'arrivée du cône de croissance au niveau de la plaque du plancher va induire une inhibition de l'activité de la protéase Calpain, celle-ci ne va alors plus couper la PlexinA1, permettant ainsi la mise en place de la répulsion induite par la Sema3B et empêchant certains neurones commissuraux de croiser de nouveau la ligne médiane (Nawabi et al., 2010) (Figure 2-C et D)

L'importance des modifications post-traductionnelles dans les mécanismes de transductions de signaux a depuis longtemps été établie. Pour ne citer qu'un exemple on peut évoquer la nécessité de la phosphorylation par Cdk5 et GSK3 $\beta$  de CRMP2 pour l'induction du collapse de cône de croissance par la sémaphorine 3A (Uchida et al., 2005) (Figure 2-E et chapitre 8.3.3.2). Ces modifications peuvent être une conséquence de la signalisation induite par une molécule de guidage, ou alors une condition préalable à la transduction du signal.

Enfin, les concentrations locales en calcium sont particulièrement importantes dans la détermination de la direction de croissance axonale. En effet, il a été montré que le relargage local par photoactivation de calcium emprisonné est suffisant pour induire une attraction ou une répulsion du cône de croissance en fonction des concentrations basales en calcium intracellulaire (Zheng, 2000). Les niveaux des seconds messagers, AMP cyclique et GMP cyclique, semblent aussi très importants dans la détermination des effets d'une molécule de guidage.

En effet, l'incubation d'une version d'AMP cyclique non hydrolysable avec des neurones en culture est suffisante pour inverser la réponse de ces neurones à cette même molécule de guidage (Song et al., 1997, 1998) (Figure 2 - F).

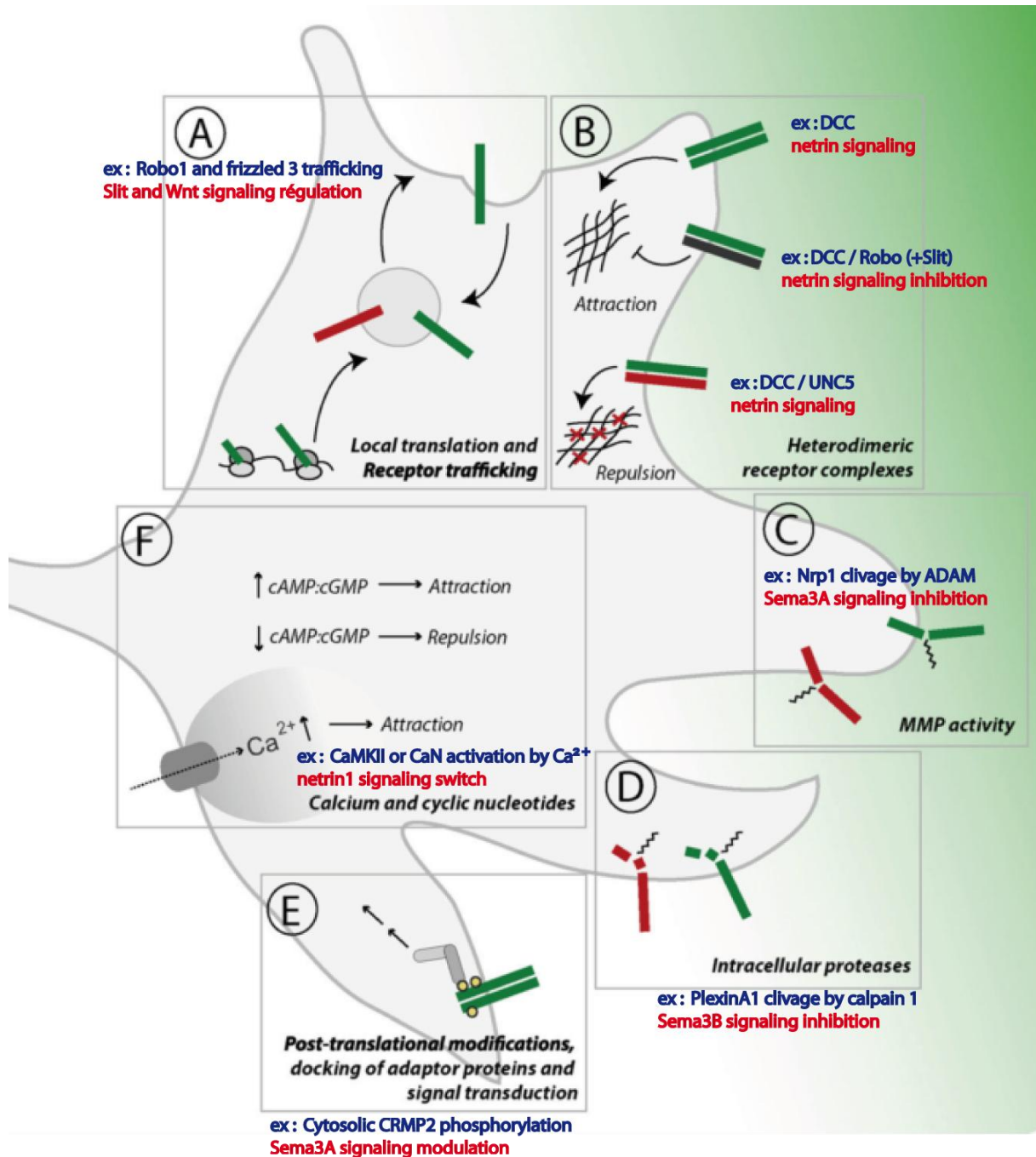


Figure 2 : Schéma récapitulatif des mécanismes régulant l'inversion rapide des effets d'une signalisation ou son inhibition. Adapté de (Kaplan et al., 2014)

### 3.3.2 Combinatoire

Parmi les mécanismes permettant d'augmenter les possibilités de réponse aux molécules de guidage, celui donnant la plus grande diversité est sans doute la combinatoire, c'est à dire les effets que peuvent engendrer l'association combinée de plusieurs molécules de guidage ainsi que de plusieurs récepteurs pour ces molécules.

#### 3.3.2.1 Addition

Dans une revue, Morales et Kania présentent les différents types de combinaisons possibles qu'ils divisent en quatre parties (Morales and Kania, 2016). Tout d'abord l'additivité, où l'action combinée de deux molécules de guidage a pour résultante, sur la croissance axonale, la somme des effets individuels de chacune des molécules. Par exemple, la formation des projections thalamocorticales est sous le contrôle de la molécule de guidage draxine et de ses récepteurs DCC et néogénine. Les souris KO Draxine présentent un défaut sévère de ces projections, celles-ci n'entrant plus dans le cortex. Les souris KO DCC ou KO néogénine présentent une plus faible altération de ce réseau neuronal. Enfin les souris double KO DCC/néogénine phénotypent avec les souris KO Draxine montrant que l'action de chacun de ces deux récepteurs agit simultanément sur la formation des projections thalamocorticales (Shinmyo et al., 2015).

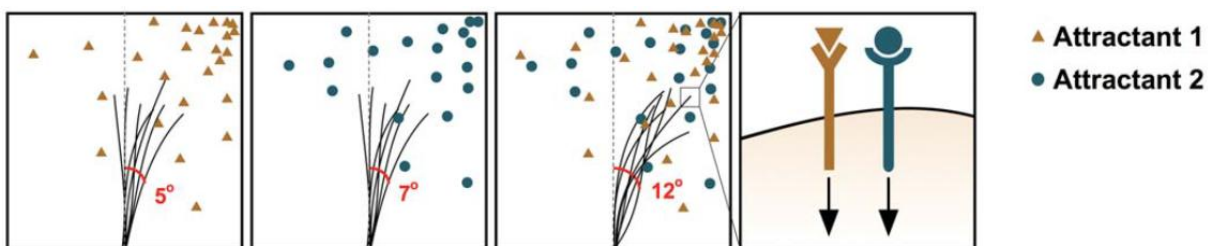


Figure 3 : Schéma explicatif de l'additivité de deux molécules de guidage axonal.

Adapté de (Morales and Kania, 2016).

### 3.3.2.2 Synergie

Une seconde combinatoire, relativement similaire, est aussi observée. On parle d'action synergique entre deux signalisations lorsque l'effet de l'une ne s'additionne pas seulement à l'autre mais va la potentialiser. Ce mécanisme peut tout aussi bien concerner deux signalisations congruentes (deux signalisations additives ou deux répulsives), que deux signalisations opposées. Si on reprend l'exemple de la croissance des neurones commissuraux au niveau de la plaque du plancher, on peut voir que durant la phase attractive le récepteur Robo3.1 est exprimé.

Celui-ci va non seulement participer à l'inhibition de la signalisation répulsive de Slit (Sabatier et al., 2004), mais aussi potentialiser la signalisation attractive entre nétrine-1 et DCC (Zelina et al., 2014).

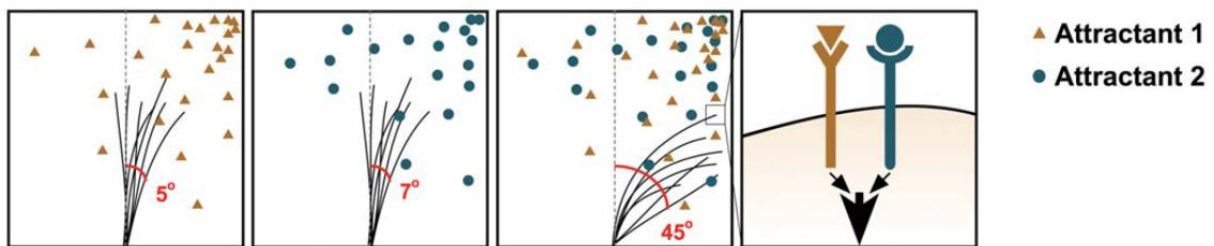


Figure 4 : Schéma explicatif de l'effet synergique de deux molécules de guidage axonal.  
Adapté de (Morales and Kania, 2016).

### 3.3.2.3 Permission

Certaines molécules de guidage ne sont fonctionnelles qu'en présence d'une seconde. C'est le cas de la nétrine-1 sur les neurones thalamiques. En effet la nétrine-1 seule n'a pas d'effet sur ces neurones alors que Slit est répulsive. En revanche lorsque les deux molécules de guidage sont présentes, la signalisation nétrine-1 dépendante devient possible et va induire une réponse attractive de ces neurones (Bielle et al., 2011).

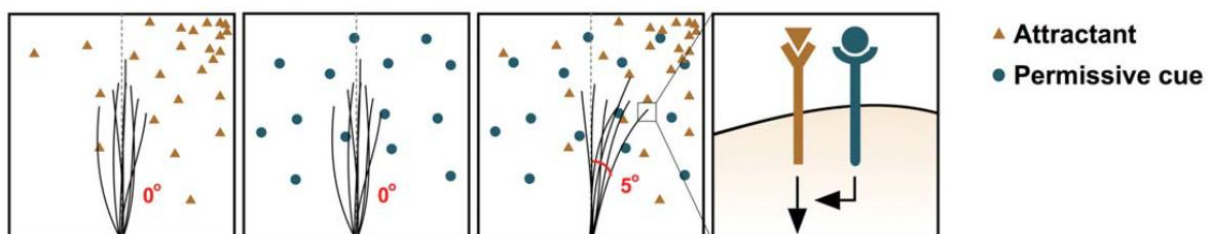


Figure 5 : Schéma explicatif de l'effet permissif entre deux molécules de guidage axonal.  
Adapté de (Morales and Kania, 2016).

### 3.3.2.4 Inhibition

Dans certains cas la signalisation induite par une molécule de guidage peut primer sur une seconde. Cette hiérarchie de signalisations est une nouvelle fois mise en évidence par l'exemple de la croissance des neurones commissuraux. On observe que ces neurones sont capables de répondre à la fois à l'attraction induite par l'interaction DCC/nétrine mais aussi à la répulsion induite par Robo/Slit. Cependant lorsque ces deux signalisations sont présentes, la signalisation nétrine est inhibée par l'interaction Robo/DCC au profit de la répulsion induite par Slit (Stein and Tessier-Lavigne, 2001).

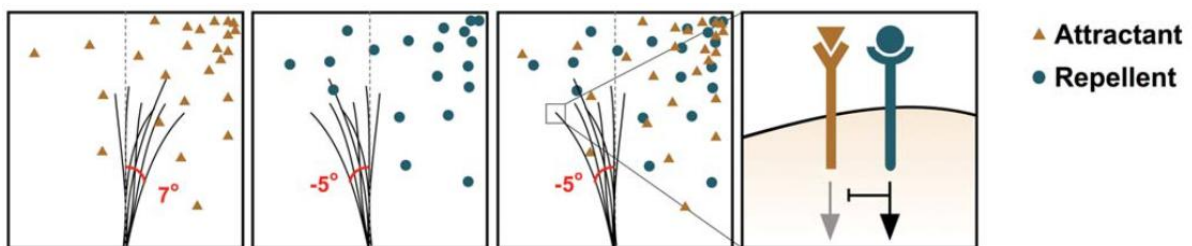


Figure 6 : Schéma explicatif de l'inhibition d'une molécule de guidage axonal sur une autre.  
Adapté de (Morales and Kania, 2016).

## 4 Bases moléculaires de la motilité du cône de croissance

### 4.1 Rencontre entre cône de croissance et un ligand attractif.

Le cône de croissance axonale correspond à la structure la plus distale de l'axone. Il joue le rôle de senseur de l'environnement dans lequel pousse cet axone, ce qui lui permet de déterminer la direction de sa croissance. Dans ce but, le cône de croissance est composé de 3 régions, un domaine central (domaine C), une zone de transition (zone T), et un domaine périphérique (domaine P) (Figure 7). Le domaine central est majoritairement composé de microtubules associés en faisceaux. Il va permettre la croissance de l'axone et la stabilisation de la portion axonale nouvellement formée. La zone de transition est à l'interface entre les réseaux de microtubules et d'actine. Riche en Myosine II, elle est le lieu de contraction de l'actine permettant d'attirer le domaine central dans une direction donnée. Enfin le domaine périphérique, composé d'un réseau dense d'actine réparti au sein des filopodes et des lamellipodes est le lieu de progression dirigée du cône de croissance. C'est la véritable région sensitive permettant la détection des indices extracellulaires guidant la croissance axonale (pour revue voir Lowery and Van Vactor, 2009).

Le processus de croissance axonale peut être subdivisé en quatre grandes étapes:

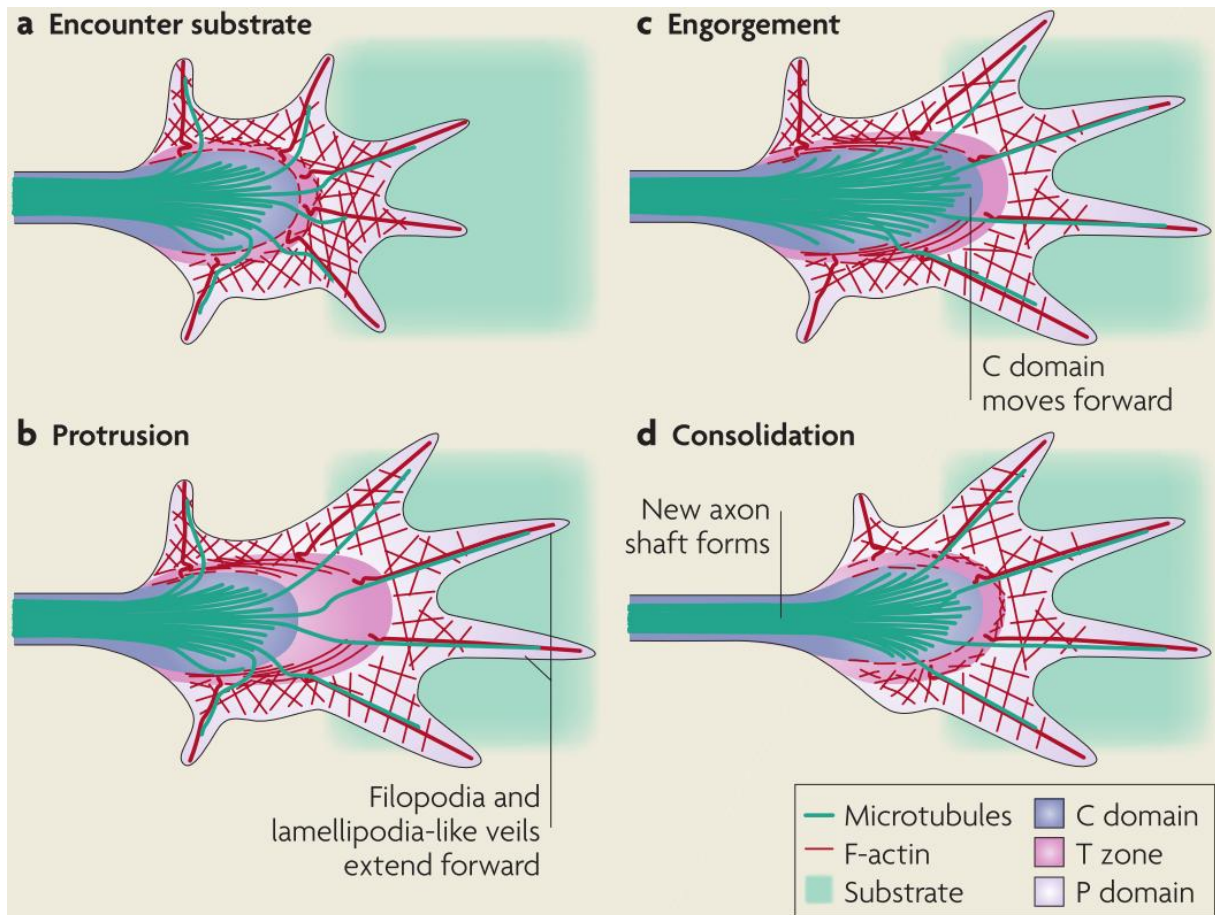
Tout d'abord le domaine périphérique va rencontrer un substrat adhésif dans l'environnement (Figure 7-a). Ceci va induire une cascade de signalisation permettant la mise en place d'un complexe protéique qui va relier le réseau local d'actine à ce substrat adhésif. Ce phénomène va rompre l'équilibre dynamique des filaments d'actine (détails au chapitre 4.2).

La liaison de l'actine filamenteuse (actine-F) au substrat adhésif conduit à la phase de protrusion durant laquelle les filopodes, poussés par la polymérisation à l'extrémité barbée de l'actine-F, vont croître. Conjointement, la zone T va s'élargir suite à la dépolymérisation de l'extrémité pointue de cette actine-F (Figure 7-b).

Une fois que l'élargissement de la zone T a atteint la zone de liaison entre l'actine-F et le substrat adhésif, vient la phase d'engorgement. Durant cette phase, la polymérisation des microtubules entre en jeu, et conduit à l'invasion de ceux-ci en direction de la zone T. Ces microtubules sont guidés par les bundles d'actine qui forment des arcs en direction de la zone d'attachement tout autour des microtubules (Figure 7-c).



Enfin, une phase de consolidation se met en place durant laquelle la portion proximale du cône de croissance va se condenser. Les arcs d'actine, vont se contracter autour des microtubules sous l'effet de la myosine II. Et les protéines stabilisatrices des microtubules vont se mettre en place (Figure 7-d).

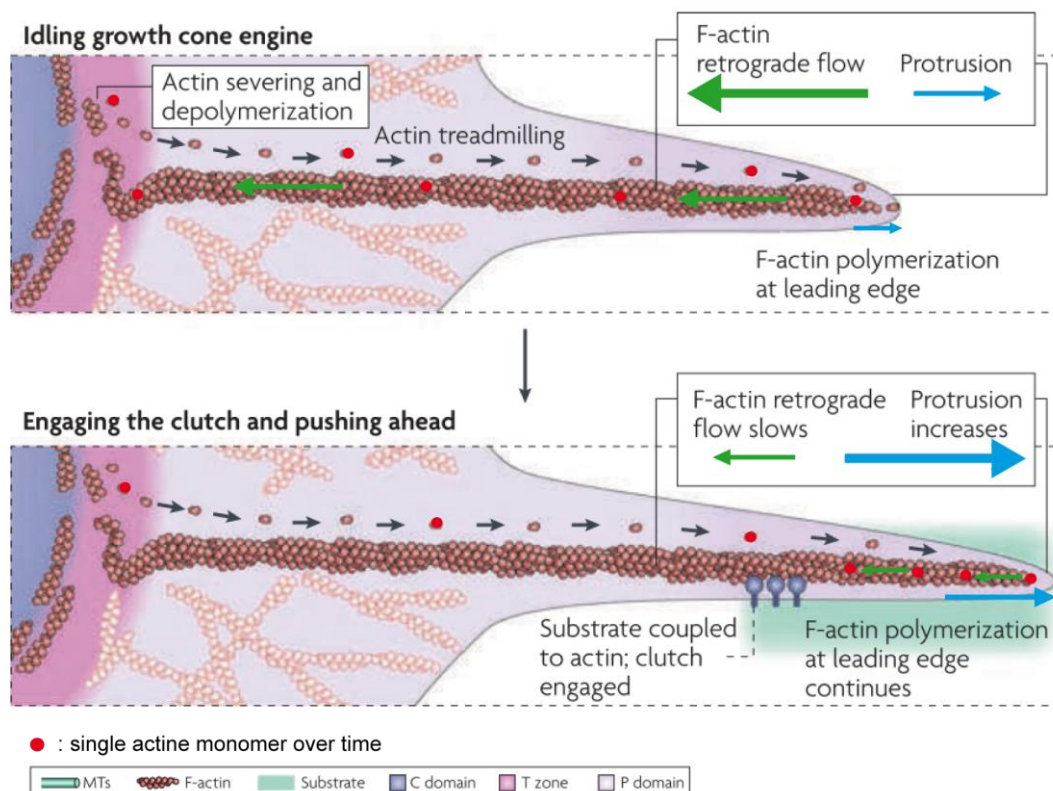


**Figure 7 : Schéma des grandes étapes de remodelage du cône de croissance conduisant à la croissance axonale. Ici le processus est enclenché à la suite de la liaison du cône de croissance à un substrat extracellulaire attractif.**  
Adapté de (Lowery and Van Vactor, 2009)



## 4.2 Précisions sur l'équilibre dynamique de l'actine-F au sein du domaine périphérique, ou phénomène de "tapis roulant".

Au niveau des filopodes du cône de croissance, l'actine-F est dans un état d'équilibre dynamique. En effet la polymérisation de ces filaments à l'extrémité distale du filopode, est compensée par leur dépolymérisation au niveau de la zone T. Les monomères d'actine glomérulaire (actine-G) sont alors transportés vers l'extrémité distale pour être de nouveau polymérisés en actine-F. A cet état d'équilibre, on observe un flux rétrograde des actines-G au sein des filaments d'actine, et le maintien d'une longueur constante des filaments d'actine (Figure 8). En revanche en présence d'un substrat adhésif, la création d'un complexe protéique, composé entre autres de molécules d'adhérence comme les intégrines ou les cadhérines, va lier ce substrat extracellulaire aux filaments d'actine. Cette liaison va bloquer le flux rétrograde d'actine. Ceci va provoquer un allongement de l'actine-F à son extrémité distale, conduisant à la protrusion du filopode dans la direction du substrat adhésif. De l'autre côté, la dépolymérisation de l'actine-F à son extrémité pointue (proximale) va conduire à l'élargissement de la zone T.



**Figure 8 : Schéma explicatif du mécanisme de "tapis roulant" de l'actine G (points rouges) au sein des filopodes du cône de croissance. Le couplage des filaments d'actine avec le substrat extracellulaire inhibe le flux rétrograde d'actine (flèche verte) et favorise ainsi l'avancée des filaments d'actine à l'extrémité du filopode (flèche bleue).**

Adapté de (Lowery and Van Vactor, 2009).

### 4.3 Modulation de la dynamique de l'actine

Il existe un grand nombre d'évidences suggérant l'importance, dans la croissance et le guidage axonal, des cascades de signalisations conduisant à la modulation des Rho GTPases telles que RhoA, Rac1 ou CDC42. Par exemple, la perte de fonction des trois Rac GTPases (Rac1, Rac2 et Mtl) conduit chez la drosophile à des défauts de branchement, de guidage et de croissance axonale (Ng et al., 2002). Au contraire, c'est la surexpression de mutants constitutivement actifs de CDC42 qui conduit à des défauts de guidage axonal chez la drosophile (Kim et al., 2002).

Ces Rho GTPases sont sous le contrôle d'activateurs et inactivateurs nommés respectivement GEF (Guanine Exchange Factors) et GAP (GTPases-activating proteins). Ces GEF et GAP vont modifier l'état des Rho GTPases, qui peuvent être soit liées à un GTP à l'état actif (facilité par l'action des GEF) soit liées à un GDP à l'état inactif (facilité par l'action des GAP) (Figure 9).

Bien sûr, la diversité des cascades de signalisation est importante pour la capacité des neurones à répondre spécifiquement à différents signaux de croissance axonale. Paradoxalement, une partie de ces signalisations sont communes entre elles. Par exemple, l'activité des Rho GTPases clefs telles que RhoA, Rac1 ou CDC42 va être modulée par la plupart des familles de molécules de guidage (Huber et al., 2003; Govek et al., 2005) (Figure 9 et chapitre 3.2.1). Cependant, une plus grande spécificité, ainsi qu'une plus grande diversité sont retrouvées pour les régulateurs des Rho GTPases. Ainsi plus de 70 protéines GEFs et 80 GAPs ont été identifiées à ce jour. Ces régulateurs possèdent différentes spécificités d'action sur les Rho GTPases ainsi que différentes spécificités d'expression spatio-temporelle (Tcherkezian and Lamarche-vane, 2007; Heasman and Ridley, 2008).

Parmi les protéines effectrices retrouvées en aval des signalisations des Rho GTPases, sont présentes de nombreuses protéines affectant le cytosquelette d'actine. On peut citer la protéine nucléatrice ARP2/3 ainsi que ses activateurs WASP ou WAVE, qui vont conduire à la stimulation de la nucléation et de la polymérisation de l'actine nécessaire à la protrusion des filopodes. On retrouve aussi les chaînes légères de myosine (MLC) dont la phosphorylation, stimulée par les Rho GTPases, va modifier l'activité contractile de l'actomyosine lors de la rétraction du cône de croissance (Govek et al., 2005).

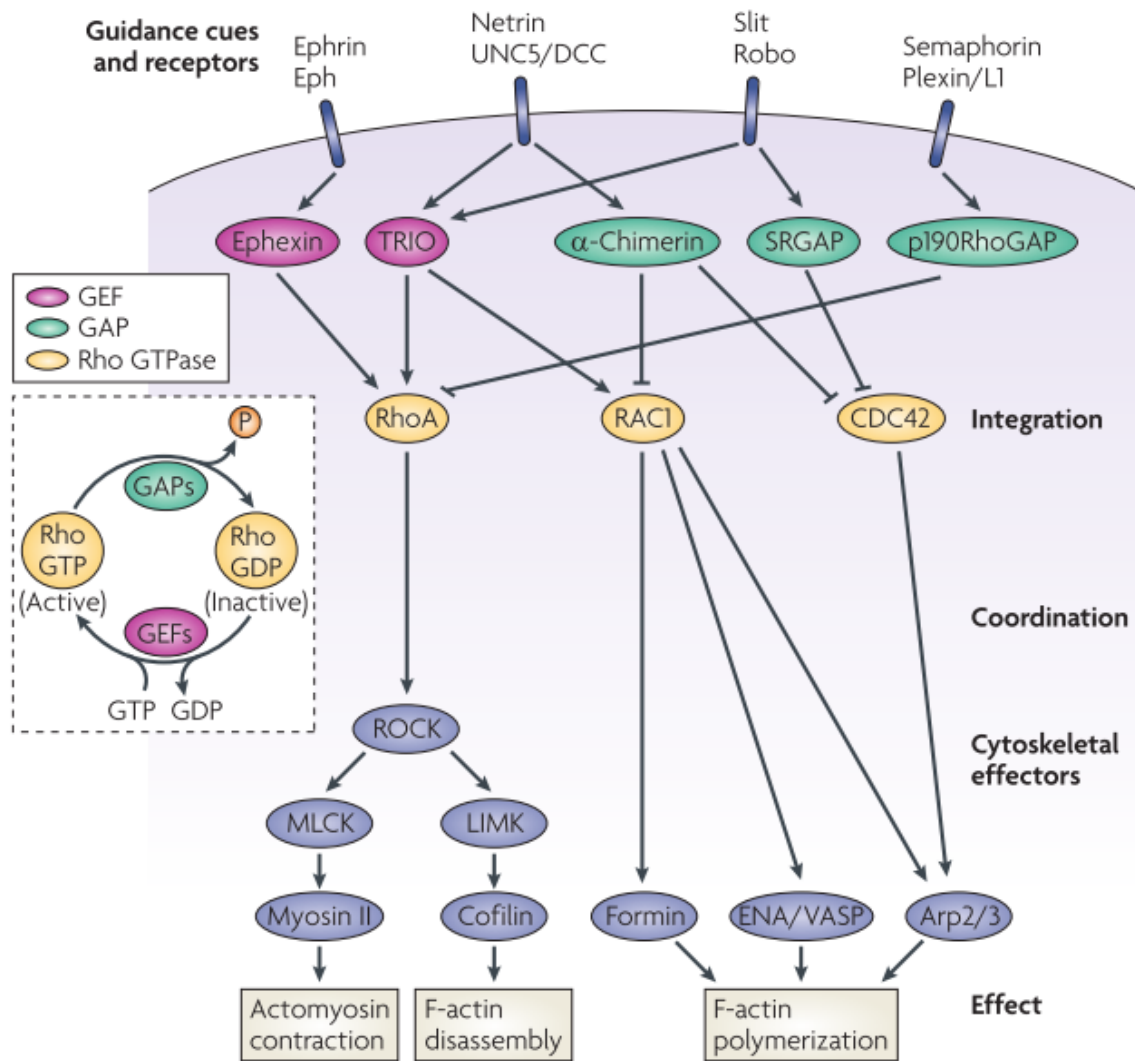


Figure 9 : La place centrale des Rho GTPases dans la transduction des signaux des molécules de guidage à travers le contrôle de la dynamique de l'actine.

La transduction du signal apporté par les molécule de guidage conduit à l'activation ou l'inhibition d'une ou plusieurs GEF/GAP modulant ainsi l'activité des Rho GTPases sur les protéines effectrices qui vont en retour affecter localement la dynamique du cytosquelette d'actine.

Adapté de (Lowery and Van Vactor, 2009).

#### 4.4 Importance des microtubules

Il est clair que le cytosquelette d'actine joue un rôle primordial dans la croissance axonale, et plus particulièrement lorsque celle-ci est modulée par l'environnement cellulaire. En effet, sans dynamique de l'actine-F, les cônes de croissance ne sont plus capables de détecter spécifiquement la présence de substrats de culture comme la laminine ou la polylysine (Marsh and Letourneau, 1984; Turney and Bridgman, 2005). Cependant, l'utilisation d'inhibiteur de la polymérisation de l'actine, tout comme l'utilisation d'inhibiteur de l'activité de la myosine, a permis de démontrer que la dynamique de l'actine-F n'est pas indispensable à l'élongation de l'axone, qui est alors seulement ralentie. Ceci n'exclut cependant pas un rôle des microtubules dans le guidage axonal. En effet, l'application locale de taxol (une drogue stabilisatrice des microtubules) va induire une réorganisation du cône de croissance en direction du gradient de diffusion de cette drogue (Buck and Zheng, 2002).

L'exploration par des microtubules très dynamiques, à l'intérieur des filopodes dans la zone P des cônes de croissance, a été observée (Schaefer et al., 2002). La fonction de ces microtubules n'est pas précisément établie. Cependant il a récemment été montré que ces microtubules sont capables de se lier au récepteur DCC, plus précisément à travers l'isoforme TUBB3 de la  $\beta$ -tubuline. Cette liaison est favorisée par le ligand de DCC, la nétrine (Qu et al., 2013). Un modèle a été établi selon lequel la liaison entre nétrine, DCC, et tubuline permettrait de stabiliser les microtubules explorateurs au niveau des filopodes. Ceci aboutirait ainsi à l'inhibition de la rétraction du filopode conduisant à une croissance axonale dans cette direction. Semblant confirmer ce modèle, l'utilisation de drogues stabilisatrices ou déstabilisatrices des microtubules va abolir la réponse attractive ou répulsive induite sur le cône de croissance par la nétrine (Buck and Zheng, 2002). De même, l'inhibition de l'expression de TUBB3 bloque aussi la croissance axonale induite par la nétrine-1 *in vivo* et *in vitro* (Qu et al., 2013).

D'autres évidences soutiennent l'importance des microtubules dans l'établissement d'une croissance axonale dirigée. Par exemple, la présence des MAP (Microtubule Associated Protein), telles que MAP1B, CRMP (Collapsin Response Mediator Protein) (Chapitre 8.3.3.2) ou CLASP, est nécessaire à certains processus de guidage axonal et leur dérégulation induit des défauts de croissance axonale de manière générale. Les +TIPs, tels que APC et EB1, sont enrichis dans les cônes de croissance et leur perturbation locale provoque aussi des défauts de croissance axonale (pour revue voir Liu and Dwyer, 2014).

D'autre part le couplage entre cytosquelette d'actine et microtubules semble lui aussi important dans la croissance axonale. Cette liaison entre microtubule et actine a commencé à être établie par l'observation du comportement des microtubules au sein du cône de croissance. Il a pu être montré un couplage entre la dynamique des microtubules et le flux rétrograde d'actine (Schaefer et al., 2002) et de la même manière le réseau d'arcs d'actine (en périphérie du domaine C) dirige l'orientation de la polymérisation des microtubules (Schaefer et al., 2002, 2008). La voie de signalisation par laquelle passe ce mécanisme n'est pas encore établie, cependant il est possible de spéculer quant à l'implication de certaines MAPs capables de se lier aux deux cytosquelettes, telles que CRMP (voir chapitre 8.3.1) ou Tau (Elie et al., 2015).

#### 4.5 Régulation de la dynamique des microtubules

La superfamille Ras des petites GTPases, (Rho, Ras, Arf, Sar et Ran) joue aussi un rôle important dans la régulation de la croissance axonale en modulant non seulement la dynamique de la F-actine mais aussi celle des microtubules. Par exemple, dans la signalisation apportée par la Sema3A certains membres de la famille des Rho tels que Rnd1 ou Rnd2 peuvent moduler l'activité de PI3 kinase et ainsi modifier la dynamique des microtubules à travers la voie de signalisation Akt/GSK3 $\beta$  (Ito et al., 2006). De plus, elle est capable de réguler les fonctions de nombre de MAPs comme MAP1B, CRMP ou CLASP (Liu and Dwyer, 2014).

La kinase GSK3 $\beta$  est impliquée, avec CDK5, dans de multiples signalisations de guidage axonal. Elle est capable de phosphoryler de nombreuses MAPs telles que MAP1B, Tau, CRMP ou APC. Et les activations ou inhibitions de ces protéines par phosphorylation vont toutes influencer la dynamique des microtubules, tout en conduisant à des défauts de croissance axonale (pour revue voir Liu and Dwyer, 2014) (Chapitre 8.3.3.2).

## 5 Précisions sur la Sémaphorine 3E

### 5.1 Mécanismes d'action de la Sema3E

La sémaphorine 3E (Sema3E) présente quelques particularités par rapport aux autres membres de la classe 3. En effet, si les neuropilines-1 et 2 sont les récepteurs des Sema secrétées, dans le cas de la Sema3E, celle-ci va se lier à la pléxine-D1 (Gu, 2005).

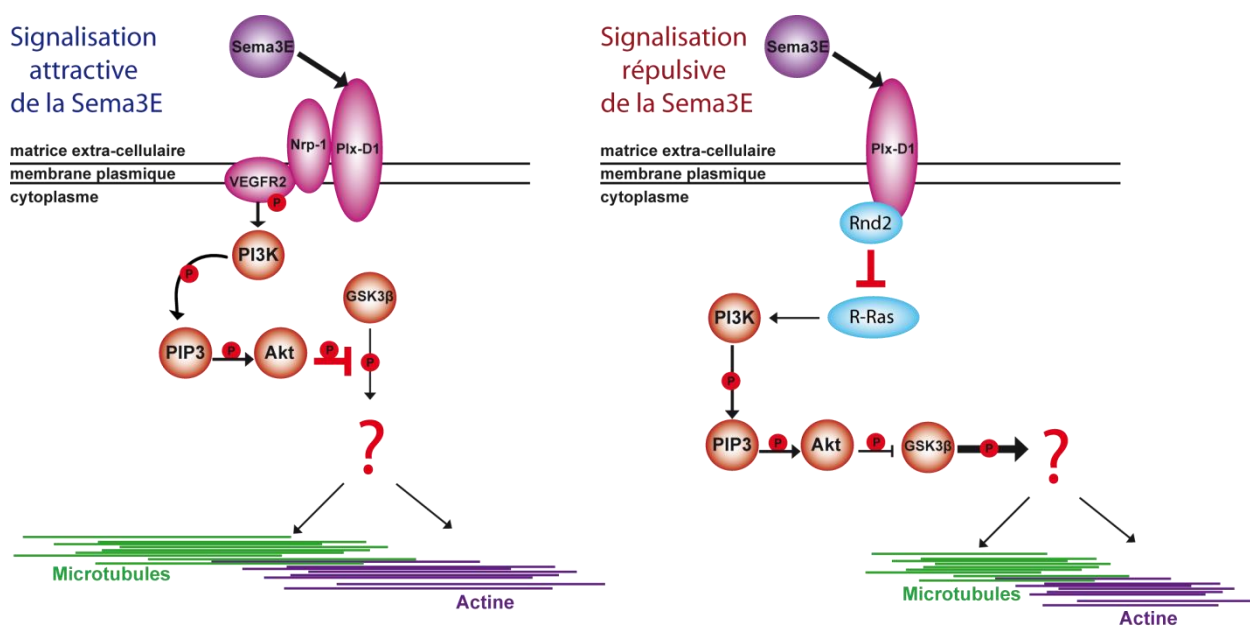
#### 5.1.1 Attraction versus répulsion

La sémaphorine 3E est bi-fonctionnelle : elle va stimuler la croissance axonale des neurones subiculaires mais va également avoir un effet répulsif sur certaines sous-populations de neurones corticaux (cortex piriforme) (Chauvet et al., 2007). Il a été montré que c'est la composition de l'holorécepteur qui va permettre cette bi-fonctionnalité de la Sema3E. En effet, les neurones subiculaires expriment la neuropiline-1 ainsi que la pléxine-D1 et sont attirés par la Sema3E, tandis que les neurones corticaux n'expriment que la pléxine-D1 et sont repoussés par la Sema3E. Par la suite il a été établi que la transduction du signal attractif de la Sema3E n'est pas réalisée par la pléxine-D1 ni même par la neuropiline-1 mais par le récepteur VEGFR2 (Vascular Endothelial Growth Factor Receptor 2) (Bellon et al., 2010). Pour le montrer les auteurs utilisent des cultures de neurones thalamiques car ils n'expriment aucun des récepteurs de la Sema3E. Ils mettent ainsi en évidence que le traitement de ces neurones avec de la SemaE, lors de la surexpression de mutants de pléxine-D1 et de neuropiline-1 n'ayant plus leur domaine intracellulaire et en présence de VEGFR2, permet tout de même d'induire une stimulation de la croissance de leurs axones. Les auteurs montrent alors que c'est par l'intermédiaire du corécepteur VEGFR2 que ce signal est transduit.

La pléxine-D1, commune aux deux voies de signalisation induites par la Sema3E, est fortement exprimé dans certaines sous-populations neuronales. On remarque particulièrement une forte expression au niveau des couches corticales IV et V, du striatum et du subiculum (Chauvet et al., 2007; Molyneaux et al., 2009; Ding et al., 2012).

L'étude des souris invalidées pour le gène de la Sema3E a mis en évidence son importance dans la formation d'au moins trois faisceaux neuronaux. D'une part le fornix, formé par les projections axonales des neurones du subiculum, sur lequel la Sema3E a un effet attractif (voir détails chapitre 6.1.2). D'autre part les projections striato-nigrales, qui n'expriment que la pléxine-D1, vont éviter les sources de Sema3E présentes autour de leur trajectoire (Chauvet et al., 2007). Chez les souris KO Sema3E, on observe des erreurs de guidage de ces neurones qui vont quitter la capsule interne et projeter leurs axones au niveau du noyau thalamique réticulé au lieu de focaliser en direction de la substance noire réticulée (Chauvet et al., 2007; Ehrman et al., 2013; Burk et al., 2017). Enfin, la commissure antérieure, au niveau de son passage inter-hémisphérique, voit son diamètre augmenté en l'absence de Sema3E ou de pléxine-D1 mettant ici aussi en cause la répulsion axonale induite par cette sémaphorine (Burk et al., 2017). En effet, cette commissure est formée en partie par les neurones du cortex piriforme qui expriment la pléxine-D1 et dont la croissance axonale est inhibée, en culture, par la Sema3E (Chauvet et al., 2007; Burk et al., 2017). Dans cette dernière étude, les auteurs montrent que la transduction du signal répulsif de la Sema3E est permise par l'endocytose du récepteur pléxine-D1 lors de son activation. Ils montrent par ailleurs que l'interaction de pléxine-D1 avec la protéine GIPC1 va permettre l'adressage du récepteur vers des compartiments vésiculaires spécifiques, facilitant ainsi son action d'inhibition de la Rho GTPase R-Ras enrichie dans ces types de vésicules (Rab4 et Rab11 positives). Enfin, GIPC1 est nécessaire au recyclage de la pléxine-D1 à la surface de la membrane plasmique, facilitant vraisemblablement aussi cette voie de signalisation par ce biais (Burk et al., 2017).

En conclusion, la transduction du signal apporté par la sémaphorine 3E va avoir un effet répulsif sur la croissance axonale des neurones exprimant uniquement le récepteur pléxine-D1, en revanche, cette sémaphorine aura un effet attractif sur les axones des neurones exprimant le complexe de récepteur tripartite pléxine-D1/neuropiline-1/VEGFR2 (Figure 10). Dans les deux cas, ces voies de signalisation vont moduler la voie Pi3 kinase/Akt. La voie de signalisation attractive va ainsi stimuler la phosphorylation d'Akt et de GSK3 $\beta$  inhibant ainsi l'activité de cette dernière (Bellon et al., 2010). En revanche, dans la voie de signalisation répulsive de la Sema3E, l'activité Rho GAP de la pléxine-D1 va aboutir, en présence de Rnd2, à l'inhibition de la Rho GTPase R-Ras. Ceci va conduire à la déphosphorylation de Akt et à la levée d'inhibition de GSK3 $\beta$  (Ito et al., 2006; Uesugi et al., 2009; Silver et al., 2014) (Figure 10).



**Figure 10 : Schéma récapitulatif de la bi-fonctionnalité de la sémaphorine 3E et des connaissances de la cascade de signalisation qui en découle.**

L'effet attractif de la Sema3E est permis en présence du complexe récepteur tripartite (neuropiline-1, pléxine-D1, VEGFR2), il conduit dans ce cas à la phosphorylation de Akt et à l'inhibition de la kinase GSK3 $\beta$ . L'effet répulsif de la Sema3E est permis en l'absence de neuropiline-1, il conduit à la déphosphorylation de Akt à travers l'inhibition de R-Ras, ceci maintient l'activité kinase de GSK3 $\beta$ . La transduction du signal étant réalisée par la pléxine-D1 pour l'effet répulsif, et par le VEGFR2 dans l'effet attractif.

On remarquera que les effecteurs finaux de cette voie de signalisation modulant la dynamique des cytosquelettes de microtubules et d'actine n'ont pas été identifiés.

Adapté de (Ito et al., 2006; Uesugi et al., 2009; Bellon et al., 2010; Silver et al., 2014).



### 5.1.2 Vascularisation

La Sema3E contrôle la vascularisation inter-somitique indépendamment de la neuropiline-1. On observe un gradient d'expression de la Sema3E caudo-rostral au niveau des somites dès le jour embryonnaire E10.5. Ce gradient va avoir un effet répulsif sur les cellules endothéliales exprimant pléxine-D1, restreignant l'invasion du réseau vasculaire dans la région inter-somitique (Gu, 2005). Cette restriction est perdue à la fois chez les embryons de souris KO Sema3E ou KO pléxine-D1 (Gu, 2005).

Une fonction répulsive similaire de la Sema3E a aussi été identifiée pour la formation de l'aorte dorsale. Pour cette fonction le Sema3E est très tôt exprimée au niveau de la notochorde et de la plaque mésodermique latérale, afin d'établir deux régions avasculaires nécessaires à la restriction de la formation de l'aorte dorsale entre ces deux régions (Meadows et al., 2012).

La Sema3E stimule aussi la vascularisation rétinienne (Kim et al., 2011). Dans cette fonction l'expression de la Sema3E est uniforme. A l'inverse, c'est l'expression de la pléxine-D1 qui va être finement régulée, au niveau de l'extrémité en croissance des vaisseaux, par le VEGF (Fukushima et al., 2011; Kim et al., 2011). En retour, la signalisation Sema3E/pléxine-D1 va réguler négativement la signalisation Dll4/Notch induite par le VEGF, formant ainsi une boucle de rétro-contrôle. La Sema3E va promouvoir la vascularisation à travers l'activation de la GTPase RhoJ et l'inactivation de Cdc42, à l'inverse, le VEGF va lui activer Cdc42 et inactiver RhoJ dans la signalisation Dll4/Notch. Les embryons KO Sema3E ou KO pléxine-D1 vont donc avoir une vascularisation rétinienne diminuée (Fukushima et al., 2011).

Enfin, la Sema3E stimule la vascularisation rétinienne (Kim et al., 2011). Dans cette fonction l'expression de la Sema3E est uniforme. A l'inverse, c'est l'expression de la pléxine-D1 qui va être finement régulée au niveau de l'extrémité en croissance des vaisseaux par le VEGF (Fukushima et al., 2011; Kim et al., 2011). En retour, la signalisation Sema3E/pléxine-D1 va réguler négativement la signalisation Dll4/Notch induite par le VEGF, formant ainsi une boucle de rétro-contrôle. La Sema3E va promouvoir la vascularisation à travers l'activation de la GTPase RhoJ et l'inactivation de Cdc42. Les embryons KO Sema3E ou KO pléxine-D1 vont donc avoir une vascularisation rétinienne diminuée. A l'inverse, le VEGF va lui activer Cdc42 et inactiver RhoJ (Fukushima et al., 2011).

## 6 Précisions sur le fornix

### 6.1 Un exemple de l'implication de la Sema3E dans la formation de connections interneuronales: le fornix

#### 6.1.1 Neuro-anatomie et connectivité

La formation hippocampale, est conventionnellement décrite comme étant constituée du cortex entorhinal, des trois aires CA1 à CA3, du girus denté ainsi que du subiculum (Schultz and Engelhardt, 2014). Ce subiculum est la voie de sortie principale des efférences de la formation hippocampale. Il reçoit des projections axonales venant majoritairement de l'aire CA1, mais aussi du cortex entorhinal, de l'amygdale et du noyau thalamique antérieur. En retour les projections axonales du subiculum connectent de très nombreuses régions neuronales incluant, des régions corticales (cortex rhinal, retrospinal et préfrontal), des régions thalamiques (majoritairement les noyaux hypothalamiques antérieur et postérieur, mais aussi le noyau thalamique antérieur) et la région septale (le noyau accumbens et le septum) (Witter, 2006) (Figure 11).

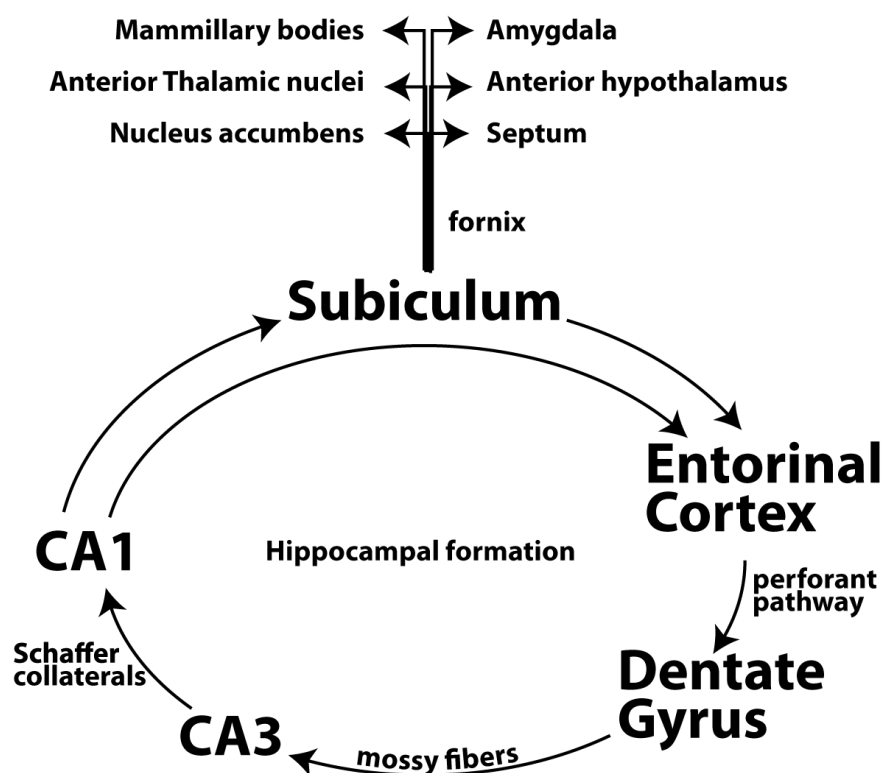
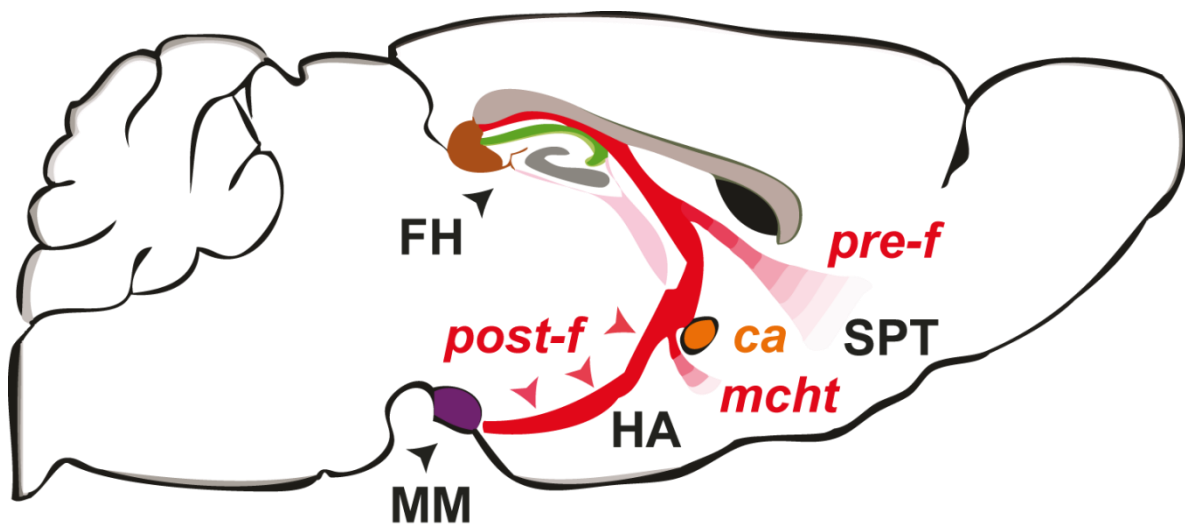


Figure 11 : Schéma simplifié des connexions afférentes et efférentes du subiculum.

La majorité des efférences viennent de l'aire CA1 de l'hippocampe tandis que la pré-commissure du fornix émet des projections dans le septum et le noyau accumbens, tandis que la post-commissure du fornix projette plus particulièrement dans les noyaux thalamiques et hypothalamiques, l'amygdale et les corps mamillaires. Adapté des informations publiées dans (Aggleton and Christiansen, 2015).

Les projections axonales du subiculum majoritairement, en association avec celles des régions CA1 et CA3, forment un faisceau d'axones composant la fimbria. Les composantes subiculaires de ce faisceau vont se compacter pour former le fornix, qui est constitué de trois portions. La portion proximale nommée fornix pré-commissural, commence dès la densification de la fimbria. Elle va adopter une trajectoire postéro-antérieure et latéro-médiale chez la souris, pour venir s'accoler au fornix contralatéral. La portion où les deux fornix sont accolés, sans pour autant former de projections inter-hémisphériques, est nommée corps du fornix. Le corps du fornix va ensuite se diviser, la pré-commissure du fornix va continuer antérieurement pour former les connections septales en avant de la commissure antérieure. L'autre partie, nommée fornix post-commissural, va contourner la commissure antérieure pour adopter une trajectoire antéro-postérieure afin de connecter les régions hypothalamiques via tout d'abord le détachement, ventralement au fornix post-commissural, d'une partie des fibres nommée faisceau cortico-hypothalamique médial (mcht) et enfin la connexion de la partie distale de ce fornix post-commissural au niveau des corps mamillaires (Figure 12).



**Figure 12 : Schéma de l'anatomie du fornix et de ses efférences principales.**

**Le fornix (en rouge) est issu des projections axonales des neurones de la formation hippocampale. La post-commissure du fornix projette majoritairement dans les corps mamillaires (en violet).**

pre-f : pré-commissure du fornix, post-f : post-commissure du fornix, FH : Formation Hippocampale, SPT : Septum, HA : Hypothalamus antérieur, MM : Corps Mamillaires, ca : commissure antérieure, mcht : médial cortico-hypothalamic tract.

### 6.1.2 **Guidage axonal du fornix**

La formation du fornix débute autour de E14 (Warner, 1980; Ashwell et al., 1996). Cette croissance va évidemment être dirigée par des molécules de guidage dont certaines ont été identifiées.

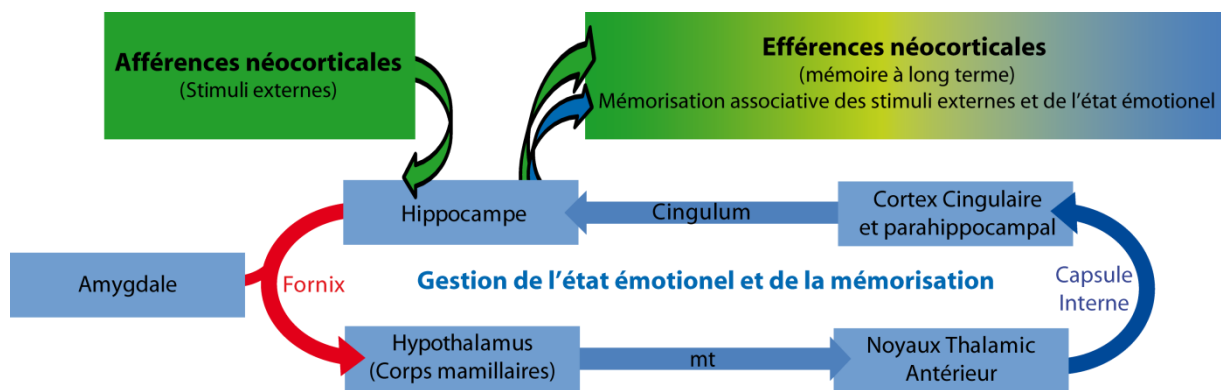
La voie attractive de la sémaphorine 3E est un acteur important dans l'établissement du fornix post-commissural. En effet les neurones du subiculum expriment la neuropiline-1 ainsi que le VEGFR2, deux corécepteurs de la pléxine-D1, essentiels à l'effet stimulateur de la Sema3E sur la croissance axonale (Chauvet et al., 2007; Bellon et al., 2010). Le traçage lipidique (Dil) du fornix chez les embryons de souris (E17.5) KO Sema3E ou KO pléxine-D1 présente un retard de développement de ce faisceau qui, à cet âge, n'a pas encore formé sa portion post-commissurale, conduisant à une diminution de son diamètre chez le jeune adulte (P30) (Chauvet et al., 2007). Au niveau comportemental, les souris KO Sema3E présentent des altérations rappelant une altération du subiculum ou des corps mamillaires, à savoir une altération de la mémorisation spatiale ainsi que de l'anxiété (Chauvet et al., 2007). La délétion conditionnelle du VEGFR2 neuronal induit, elle aussi, un retard de croissance du fornix post-commissural, conduisant à une diminution de son diamètre chez le jeune adulte (P30) (Bellon et al., 2010).

Si la Sema3E est clairement impliquée dans la formation du fornix, elle n'est pas suffisante au développement de ce faisceau. D'une part, en son absence, une partie des fibres du fornix post-commissural arrive tout de même à atteindre sa cible. Et d'autre part, l'expression de cette Sema3E sur la trajectoire de croissance du fornix est principalement réalisée par les neurones des aires CA1-CA3 dont les projections axonales suivent la même trajectoire au niveau du fornix pré-commissural. Cette expression ne permet donc pas d'expliquer comment les axones du fornix post-commissural peuvent être guidés jusqu'aux corps mamillaires.

De plus, d'autres délétions de molécules de guidage ont permis d'établir leur lien avec la formation du fornix, notamment la sémaphorine 6A dont l'absence conduit à une forte défasciculation de celui-ci (Rünker et al., 2011). La délétion de la draxine induit, elle aussi, une disparition complète du fornix post-commissural chez la souris (Zhang et al., 2010). Cependant, les auteurs montrent une forte augmentation de l'apoptose à E18.5 dans le subiculum de ces souris, pouvant expliquer l'altération des projections axonales de cette structure.

### 6.1.3 Fonction

Le fornix appartient au système limbique et plus particulièrement au circuit de Papez. Ce circuit implique différentes aires corticales et sous corticales et a pour fonction globale de gérer la mémoire et les émotions ainsi que leur association (Figure 13). Parmi les composantes principalement impliquées, on trouve l'hippocampe dans la gestion de la mémoire factuelle, tandis que l'amygdale est plus particulièrement impliquée dans la gestion de l'état émotionnel de l'individu. Elle permet, en association avec l'hippocampe, de moduler l'importance d'un souvenir par une composante émotionnelle au moment de l'établissement de celui-ci. Par ailleurs, il apparaît que l'intégrité de cette boucle est aussi importante que la fonction individuelle des différentes structures qui la composent (Thomas et al., 2011). Ainsi une lésion du fornix va, par exemple, causer de multiples symptômes, à la fois associés à la mémorisation mais aussi aux émotions.



**Figure 13 : Schéma récapitulatif des noyaux impliqués dans le circuit de Papez et de la position du fornix dans cette boucle.**

**Les afférences néocorticales apportent les informations sensorielles environnementales. Ces informations sont alors traitées et associées à l'état émotionnel de la personne par les noyaux de la boucle de Papez, avant d'être stockées à long terme dans le néocortex.**

mt : faisceau mamillo-thalamic.

#### 6.1.4 Mémoire

La plupart des études effectuées sur le rôle du fornix ont été réalisées à travers l'analyse du comportement de rongeurs après une lésion de ce faisceau ou du subiculum. Les premiers travaux ont montré, grâce au test de la piscine de Morris, des déficits de mémorisation spatiale lors d'une lésion du subiculum (Morris et al., 1990) ainsi qu'en cas de lésion bilatérale du fornix (Fletcher, 2006). Il apparaît que, contrairement à une lésion hippocampale, la lésion du fornix ne semble induire qu'un déficit de mémorisation spatiale, sans affecter la mémoire préétablie avant la lésion (Chai and White, 2004). Les travaux de Vann ont montré que les corps mamillaires sont fortement impliqués dans ce type de mémorisation, et la lésion de cette structure, ainsi que de ses efférences (le faisceau mamillo-thalamique ou mt) conduisent aussi à des déficits de mémorisation spatiale (Vann and Aggleton, 2003; Vann, 2010, 2013).

Une seconde stratégie pour l'étude des fonctions du subiculum, a été de corrélérer les enregistrements de l'activité neuronale de champ ou unitaire au sein du subiculum, pendant le déplacement libre de rats dans différents environnements. Il apparaît que tout comme au niveau de l'aire CA1, le subiculum possède des neurones (nommés "place cells") dont l'activité est dépendante de la position de l'animal dans son environnement (Sharp and Green, 1994). Cependant cette cartographie établie au sein du subiculum n'est pas aussi précise que celle établie dans l'hippocampe et semble dépendre d'autres paramètres tels que la direction du mouvement de l'animal (Sharp and Green, 1994; Sharp, 1999). Une théorie selon laquelle le subiculum permettrait l'intégration ainsi que la complémentation des informations spatiales apportées par l'hippocampe émerge (Sharp, 1999; O'Mara et al., 2009).

### 6.1.5 **Stress**

Le fornix post-commissural ainsi que le mcht connectent des régions du système limbique associées à l'axe adrénérurgique hypothalamo-pituitaire (HPA), sur lesquelles ils vont avoir un effet majoritairement inhibiteur (Lowry, 2002). En effet, la lésion du subiculum ventral (formant la plupart des projections du fornix post-commissural) induit une dérégulation de la sécrétion de glucocorticoïde en réponse à un stress, sans affecter les niveaux basaux (Herman et al., 1995). L'utilisation de différents types de stress (hypoxie, labyrinthe élevé, auditif etc...) a permis de montrer une implication différente du subiculum selon le stress. Il est alors apparu que celui-ci joue un rôle plus complexe qu'une simple inhibition de l'axe HPA et peut même avoir un effet stimulateur dans certains cas (hypoxie par exemple) (Mueller et al., 2004; Herman and Mueller, 2006).

### 6.1.6 **Motivation et récompense**

Dans la fin des années 80, Rawlins a montré l'implication du subiculum ventral dans la motivation de rats à effectuer une tâche pour obtenir une récompense (Rawlins et al., 1989). Cette observation sera confirmée plus tard par des approches pharmacologiques. En effet, l'inhibition des récepteurs dopaminergiques D1 du subiculum ventral induit une diminution des performances d'apprentissage en vue d'une récompense, ainsi qu'un point de rupture dans le test de ratio progressif plus rapidement atteint. Ceci n'affecte cependant pas les comportements moteurs spontanés et dirigés vers la nourriture. La même inhibition au niveau du subiculum dorsal n'induit pas d'effet montrant une nouvelle fois la dissociation fonctionnelle du subiculum ventral et dorsal (Andrzejewski et al., 2006).

## 7 MAP6

### 7.1 Bref Historique

Les microtubules sont des composants essentiels du cytosquelette. Ils sont impliqués dans de nombreux mécanismes cellulaires comme la division, la migration ou encore le trafic intracellulaire. Ces microtubules sont formés par la polymérisation de dimères de tubulines alpha et beta en protofilaments. Ces protofilaments s'associent alors par contacts latéraux sous forme de tubes, que l'on appelle microtubules. La capacité qu'ont certains microtubules à résister à des facteurs dépolymérisants, tels que le froid (<15°C), des drogues ou encore une forte pression hydrostatique, a depuis longtemps été observée (Robinson, 1969; Brinkley and Cartwright, 1975; Schliwa et al., 1981). Cependant deux théories s'opposaient sur l'origine de cette stabilité des microtubules au froid. Certains pensaient qu'elle était permise par une modulation des propriétés biochimiques intrinsèques de la tubuline (Brady et al., 1984; Binet et al., 1987). D'autres en revanche pensaient qu'elle impliquait un "facteur" qui s'incorporerait aux microtubules pendant leur polymérisation (Webb and Wilson, 1980).

La découverte que la stabilité des microtubules au froid, chez les vertébrés, est sensible à la présence du complexe calmoduline/Ca<sup>2+</sup> (Job et al., 1981) a permis d'élaborer une stratégie de purification de ce potentiel "facteur" stabilisateur. A partir d'une fraction enrichie de microtubules stables au froid de cerveaux de rat et en utilisant une chromatographie d'affinité sur colonne échangeuse de cation puis sur colonne de calmoduline, Job et al. identifièrent la protéine STOP (pour Stable Tubule Only Polypeptide) (Job et al., 1982). Cette protéine est aujourd'hui plus connue sous l'appellation MAP6 (pour Microtubule Associated Protein 6) et je la nommerai donc ainsi dans la suite de ce manuscrit. La production d'anticorps monoclonaux spécifiques de la protéine MAP6 a permis de purifier celle-ci en plus grande quantité sur colonne d'immuno-affinité, et de confirmer sa capacité à potentialiser la stabilité des microtubules au froid (Margolis et al., 1986).



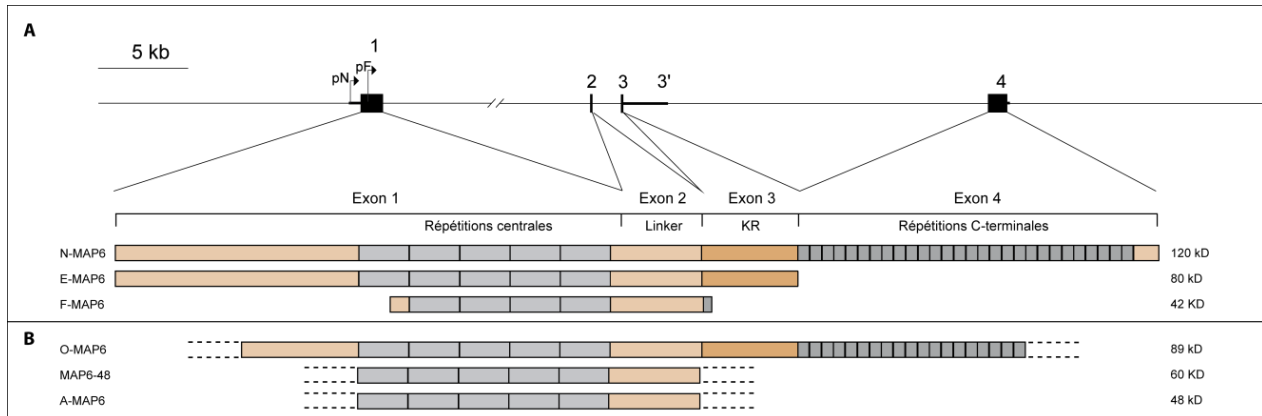
L'étude de MAP6 s'est naturellement poursuivie par le clonage et le séquençage de l'ADNc de la protéine, toujours à partir de cerveaux de rats adultes (Bosc et al., 1996). C'est une protéine basique ( $pI = 9.5$ ), présentant plusieurs motifs répétés dans sa séquence, caractéristique retrouvée chez la plupart des protéines associées aux microtubules (Lewis et al., 1988; West et al., 1991). Cette protéine de 952 acides aminés n'avait cependant aucune homologie avec d'autres MAP (Bosc et al., 1996), et était la seule protéine connue capable de stabiliser les microtubules au froid.

## 7.2 La famille MAP6

### 7.2.1 Les différentes isoformes de MAP6

La migration sur gel d'acrylamide des protéines d'un lysat de cerveau de souris adulte, ainsi qu'un lysat de lignées cellulaires (PC12 et NIH 3T3) en culture, a révélé des bandes de différents poids moléculaires. Ces bandes suggèrent que MAP6 puisse être exprimée sous différentes isoformes (Denarier et al., 1998b; Guillaud et al., 1998). Les protéines MAP6 sont codées par un seul gène qui a été localisé chez la souris (gène *Map6*) au niveau de la région E2-F1 du chromosome 7 (Denarier et al., 1998a). Le gène *Map6* est localisé sur le chromosome 1q32 chez le rat et 11q14 chez l'homme (gène *MAP6*). Les différentes isoformes de MAP6 sont des variants présentant des expressions tissulaires et développementales distinctes. Elles sont obtenues par l'épissage alternatif ou l'utilisation de promoteurs différents du gène *Map6* (Aguezzoul et al., 2003).

Ce gène comporte 4 exons, l'exon 1 code pour la portion amino-terminale de MAP6 ainsi que les répétitions centrales, l'exon 2 pour un domaine nommé "Linker", l'exon 3 pour le domaine riche en arginine nommé "KR", enfin l'exon 4 code les répétitions carboxy-terminales de la protéine (Bosc et al., 2003). Six isoformes de la protéine MAP6 ont été identifiées jusqu'à ce jour, soit par la découverte de variations d'épissage, soit par leurs immuno-réactivités croisées avec différents anticorps dirigés contre MAP6 : N-MAP6 (120kD), E-MAP6 (80kD), O-MAP6 (89kD), A-MAP6 (60kD), MAP6-48 (48kD) et F-MAP6 (42kD) (Denarier et al., 1998b; Guillaud et al., 1998; Galiano et al., 2004) (Figure 15).



**Figure 14 : Représentation schématique des différentes isoformes de MAP6 et de la correspondances entre les exon du gène *Map6* avec les différentes portion de la protéine.**

Les ADNc des N-MAP6, E-MAP6 et F-MAP6 ont été séquencés, permettant de déterminer avec précision la composition en acides aminés de leurs protéines correspondantes (A). La composition des O-MAP6, A-MAP6 et MAP6-48 reste établie de manière théorique en fonction des épitopes reconnus par les anticorps pour lesquels ces isoformes présentent une immunoréactivité (B) (Cf Figure 15).

pN = promoteur N-MAP6, pF = promoteur F-MAP6

#### 7.2.1.1 Les isoformes neuronales

Les isoformes "N" (Neuronale) et "E" (Early) de MAP6 sont spécifiques des neurones. Cette spécificité tissulaire explique l'appellation de la **N-MAP6**, tandis que le préfix "E" de la **E-MAP6** réfère au fait que le début de son expression est plus précoce lors du développement embryonnaire. On observe ainsi un déplacement de l'expression de la protéine E-MAP6, majoritaire chez l'embryon, vers la N-MAP6 qui devient majoritaire chez l'adulte. Toute fois, l'expression de E-MAP6 perdure, en moindre quantité chez l'adulte, alors que la N-MAP6 est absente jusqu'à environ 17 jours de gestation chez l'embryon de souris. La N-MAP6 est constituée de 906 acides aminés chez la souris et migre à un poids moléculaire apparent de 120kD sur gel d'acrylamide. Elle est produite par la transcription des 4 exons du gène *Map6*. La N-MAP6 est ainsi composée de la région C-terminale complète avec 28 motifs répétés. A l'inverse, la E-MAP6 est dépourvue des répétitions C-terminales suite à l'épissage alternatif du gène *Map6* conduisant à la transcription des exons 1, 2 et 3 à partir du même promoteur que N-MAP6 (Aguzzoul et al., 2003). Cependant l'épissage de l'intron entre les exons 3 et 4 conduit à la poursuite de la traduction de l'intron en aval de l'exon 3, menant très rapidement à l'apparition d'un codon stop. Il en résulte une E-MAP6 plus courte, d'un poids moléculaire apparent de 80kD chez la souris (Figure 14).

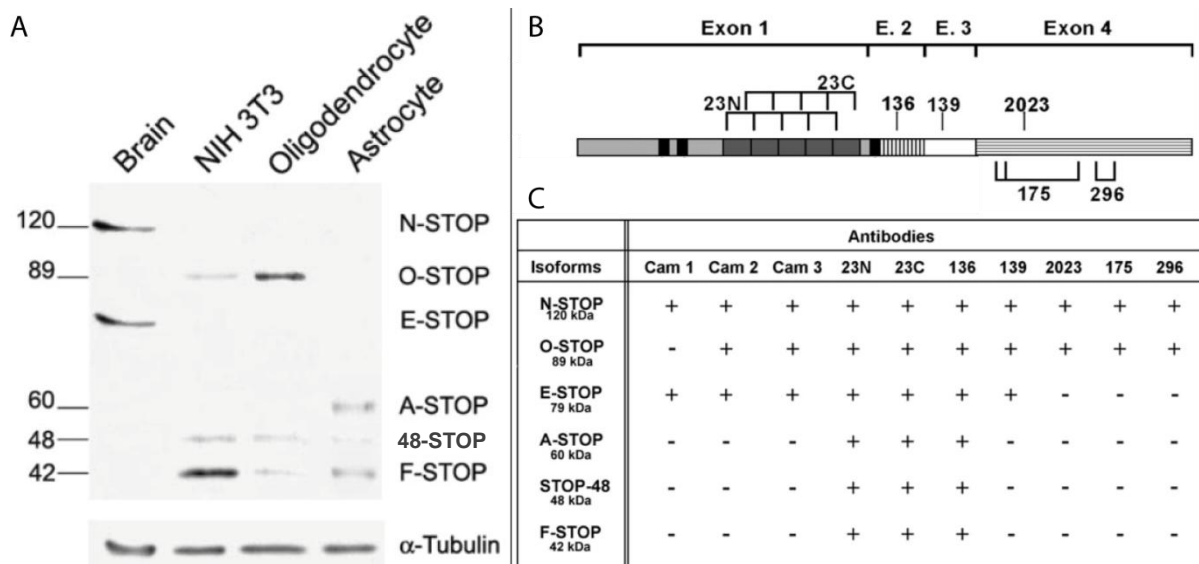
### 7.2.1.2 Les Isoformes non-neurales

Une autre isoforme de MAP6 a été caractérisée à partir d'extraits d'une lignée de fibroblastes murin (NIH 3T3), où elle est majoritairement exprimée (Figure 15). Cette protéine de 42kD a été nommée **F-MAP6** ("Fibroblastic-MAP6"). Elle est issue de l'expression du gène *Map6*, mais à partir d'un site d'initiation de la transcription situé 609 pb en aval de celui codant pour les N- et E-MAP6. L'initiation de la transcription du gène à partir de ce second site produit un ARNm composé d'une partie de l'exon 1 et de l'exon 2. Il s'ensuit alors, l'épissage alternatif de l'exon 3 et conduisant à la fusion des exons 2 et 4, et l'apparition d'un site de terminaison de la transcription 21 pb en aval de l'exon 2 (Aguzzoul et al., 2003). Cette protéine est ainsi composée essentiellement des domaines répétés centraux et du domaine Linker (Figure 14).

L'isoforme **O-MAP6** ("Oligodendrocytic-MAP6") a été partiellement caractérisée dans des oligodendrocytes matures et immatures, à l'aide d'une combinaison d'anticorps anti-MAP6 dirigés contre des épitopes de la protéine situés sur différentes portions de celle-ci (Galiano et al., 2004) (Figure 14 et 15). Cette isoforme de 89kD contiendrait donc une partie du domaine N-terminale, les répétitions centrales, le domaine Linker, le domaine KR et au moins une partie des répétitions C-terminales. Elle serait donc l'isoforme la plus proche de la N-MAP6.

L'isoforme **A-MAP6** ("Astrocytic-MAP6") a été elle aussi partiellement caractérisée selon le même procédé mais dans des cellules astrocytaires cette fois-ci (Galiano et al., 2004). Avec un poids moléculaire apparent de 60 kD, elle n'est détectable que par les anticorps dirigés contre des épitopes situés dans les répétitions centrales et le domaine Linker. Cette isoforme est donc proche de la F-MAP6 (Figure 14 et 15).

Enfin une isoforme de 48 kD, nommée **48-MAP6** est détectable à la fois dans les fibroblastes, les astrocytes et les oligodendrocytes. Cette isoforme possède la même immunoréactivité que les isoformes A-MAP6 et F-MAP6 et ne posséderait donc que les répétitions centrales et le domaine Linker en commun avec la N-MAP6 (Figure 14 et 15). Les ADNc des isoformes A- O- et 48-MAP6 n'ont pas encore été déterminés à l'heure actuelle ce qui ne nous permet pas de pouvoir affirmer formellement l'existence des ces isoformes ni la composition de leur séquence en acides aminés.



**Figure 15 : Présentation des différentes isoformes de MAP6 observées après Western-Blot de lysats de cerveaux, de fibroblastes (NIH 3T3), d'oligodendrocytes ou d'astrocytes.**

Les différentes isoformes sont révélées par immunomarquage avec l'anticorps 23C (A). Représentation schématique des localisations sur la protéine N-MAP6 des épitopes contre lesquels sont dirigés les différents anticorps anti-MAP6 (B).

Tableau représentatif des différentes immunoréactivités des isoformes de MAP6 en fonction des anticorps (C).

Adapté de (Galiano et al., 2004).

## 7.2.2 Localisation tissulaire et subcellulaire des différentes isoformes.

### 7.2.2.1 Localisation des isoformes neuronales

Les protéines MAP6 neuronales sont présentes dans toutes les aires du cerveau avec des régions où elles sont plus particulièrement exprimées telles que les glomérules du bulbe olfactif, la couche VII du cortex, l'hippocampe, l'hypothalamus et le cervelet (Andrieux et al., 2002). En revanche, certaines cellules neuronales n'expriment pas de MAP6. On peut citer, par exemple, les cellules mitrales et granulaires du bulbe olfactif ou les cellules de la couche moléculaire du cervelet (Couegnas et al., 2007).

Pour ce qui est de leur localisation subcellulaire, lorsque l'on observe des cultures de neurones des ganglions dorsaux de la moelle épinière, on retrouve MAP6 dans l'ensemble des neurones avec une forte présence au niveau de l'axone, tout le long des microtubules qui le composent (Guillaud et al., 1998). La présence de MAP6 a aussi été détectée au niveau des synapses par des expériences de microscopie électronique (Andrieux et al., 2002). L'analyse biochimique de la composition en MAP6 de synaptosomes purifiés a permis de confirmer la présence de MAP6 à la fois en pré- et post-synaptique. On note un enrichissement de MAP6 dans des fractions synaptosomales associées à des structures insolubles telles que la PSD (Andrieux et al., 2002).

Par ailleurs, une sous population de MAP6 a été observée associée à l'appareil golgien (Gory-Fauré et al., 2006, 2014; Tortosa et al., 2017). Cette relocalisation golgienne de MAP6 est sous la dépendance de sa palmitoylation N-terminale (chapitre 7.3.4). Enfin MAP6 est associée à la fraction de mitochondries purifiée à partir d'homogénats de cerveaux de souris (Gory-Fauré et al., 2014).

#### 7.2.2.2 Localisation des isoformes non-neuronales

L'étude de l'expression tissulaire de la F-MAP6 en Northern et Western Blot a montré qu'elle est exprimée dans de nombreux organes. On la retrouve en grande quantité dans les poumons, et en plus faible quantité dans les testicules, le cœur, les muscles, et les reins. En revanche, les ARNm de F-MAP6 tout comme la protéine ne sont pas détectés dans le foie et la rate (Aguezoul et al., 2003). Cette étude n'a pas été réalisée pour les autres isoformes non-neuronales.

L'analyse biochimique de différentes isoformes non-neuronales à partir d'extraits cellulaires a permis de détecter la F-MAP6 à la fois dans les fibroblastes, les oligodendrocytes et les astrocytes. Dans les fibroblastes en culture (NIH 3T3), la F-MAP6 est majoritaire (Figure 15), et principalement cytosolique. Cependant, elle se délocalise au niveau des microtubules du fuseau mitotique lors de la division de ces cellules. On retrouve cette même relocalisation microtubulaire lors de l'exposition de ces cellules au froid (4°C) (Denarier et al., 1998b).

La O-MAP6 n'est retrouvée que dans les fibroblastes et les oligodendrocytes, tandis que la A-MAP6 n'est détectable que dans les astrocytes. Enfin la MAP6-48, tout comme la F-MAP6, est détectable dans ces trois types cellulaires (Galiano et al., 2004) (Figure 15).

### 7.3 **Caractérisation des domaines fonctionnels de MAP6**

La connaissance de la séquence en acides aminés de N-MAP6 a contribué à l'identification et à la caractérisation de domaines fonctionnels des MAP6. Ces domaines sont impliqués dans de nombreuses fonctions de la protéine allant de son activité régulatrice de la dynamique des microtubules, à son adressage subcellulaire, ou encore à la régulation de son interaction avec ses partenaires.

### 7.3.1 La liaison aux microtubules par les domaines Mn et Mc

L'étude structure-fonction de MAP6 a permis d'identifier les domaines permettant la liaison de MAP6 aux microtubules (Bosc et al., 2001). On retrouve deux types de domaines distincts de par leurs séquences mais aussi leurs fonctions, les modules Mc et les modules Mn (Figure 16).

**Les modules Mc** (de 46 acides aminés chacun) correspondent, aux répétitions centrales de MAP6. Ces modules, une fois transfectés dans les cellules Hela dépourvues de MAP6 endogène, sont suffisants pour stabiliser les microtubules au froid (4°C) ou au nocodazole. On remarque cependant que l'expression d'un seul module ne suffit pas à apporter ces résistances (Bosc et al., 2001). Une étude a montré que l'affinité des modules Mc pour les microtubules est directement proportionnelle à la diminution de température. En effet ceux-ci semblent passer d'une structure de type beta à 37°C pour se déstructurer avec la diminution de température, augmentant ainsi leur affinité avec les microtubules à la fois *in vivo* et *in vitro* (Delphin et al., 2012). Cette étude permet d'expliquer la relocalisation de F-MAP6 sur les microtubules, à basse température (Denarier et al., 1998b). En effet la F-MAP6 ne possédant pas de module Mn, sa localisation aux microtubules va être directement liée à l'affinité des modules Mc pour ces derniers (Figure 16).

MAP6 est conservée au cours de l'évolution au moins depuis l'émergence de la classe des Ostéichthyens (poissons) jusqu'aux grands primates (Bosc et al., 2003). On peut alors se poser la question du rôle de MAP6 chez de nombreux animaux homéothermes, pour qui les variations de température corporelle sont faibles. On remarque cependant une variation du nombre de modules Mc entre les différentes espèces pouvant être corrélée à leur capacité ou nécessité de résistance au froid. Ainsi les espèces murines, connues pour entrer en état de torpeur lors de périodes nécessitant une économie d'énergie, peuvent avoir leur température corporelle fortement diminuée. Cette aptitude est corrélée à la présence d'au moins 4 modules Mc dans leur gène *Map6*. Une espèce murine fait cependant exception : le rat taupe (Delphin et al., 2012). Ces animaux résistent très mal aux baisses de températures, ce qui fait du froid leur première cause de mortalité. On remarque que le gène *Map6* de ces animaux ne possède qu'un seul module Mc. Enfin si on s'intéresse aux primates, dont la thermorégulation est beaucoup plus stable, ceux-ci n'ont conservé qu'un seul module Mc dans leur gène *MAP6*.

La branche des lémuriens fait cependant exception avec 3 à 6 modules Mc, mais étonnamment cette branche de primates a la particularité de rentrer en torpeur. Enfin, on peut noter que l'expression de la F-STOP est très majoritaire dans les poumons, organe fortement exposé aux températures extérieures du fait de sa fonction respiratoire. Evidemment, d'autres fonctions encore inconnues des modules Mc peuvent aussi expliquer leur conservation.

**Les modules Mn**, sont au nombre de trois (Mn1 à Mn3) et encadrent les modules Mc (Figure 16). Composés d'une séquence de 21 aa, ils sont capables à la fois de protéger les microtubules de leur dépolymérisation au froid, mais aussi contre des drogues dépolymérisantes comme le nocodazole (Bosc et al., 2001). Cette caractéristique additionnelle des modules Mn, tout comme la variation du nombre de modules en fonction des différentes isoformes de MAP6, apporte des éléments d'explication aux différences de propriété de résistance à la dépolymérisation en fonction du type cellulaire. Par exemple, dans les cellules neuronales les microtubules sont résistants à la fois au froid et aux drogues dépolymérisantes (Baas et al., 1994; Guillaud et al., 1998), tandis que dans de nombreuses cellules fibroblastiques seule la résistance au froid est conservée (Lieuvin et al., 1994; Denarier et al., 1998b). En effet ces cellules (au contraire des cellules neuronales) n'expriment pas les isoformes E et N de MAP6 qui sont deux isoformes ayant conservé l'ensemble de leurs modules Mn. Plus récemment il a été montré que le module Mn3 est impliqué dans la multimérisation de MAP6 (Gory-Fauré et al., 2014). La fonction physiologique de cette propriété n'a pas encore été élucidée. Mais on peut spéculer que MAP6, possédant deux autres domaines Mn, puisse interagir avec les microtubules en gardant cet état multimérisé et ainsi favoriser la création de faisceaux de microtubules.

### 7.3.2 **Régulation de l'activité de MAP6 sur le cytosquelette par la liaison à la Calmoduline.**

Si l'interaction des modules Mc avec les microtubules peut être régulée par la température, ce n'est pas le cas des modules Mn. D'autres mécanismes doivent donc être présents pour réguler l'activité stabilisatrice de MAP6. La capacité de MAP6 à lier directement la calmoduline en présence de calcium a été établie très tôt durant l'étude de cette protéine (Job et al., 1982).

D'autre part, l'importance de la calmoduline/Ca<sup>2+</sup> dans la déstabilisation des microtubules a elle aussi été démontrée expérimentalement (Job et al., 1981). Par la suite, l'utilisation de "peptides spots" a permis d'identifier les domaines putatifs d'interaction de MAP6 avec la calmoduline. Ces domaines furent alors confirmés par des expériences de liaison de fragments de MAP6 ou de mutants de délétion sur colonne de calmoduline (Bosc et al., 2001). On retrouve ainsi 11 sites dans MAP6 capables de lier la calmoduline. Ces sites sont nommés Cam1 à Cam7 et CamR1 à CamR4. L'ensemble des domaines de liaison aux microtubules de MAP6 chevauche avec les sites de liaison à la calmoduline. Ainsi les Mn1, Mn2 et Mn3 chevauchent respectivement les sites Cam2, Cam3 et Cam5 (Figure 16). Tandis que les quatre modules Mc, chez la souris, chevauchent les sites CamR1 à CamR4. Ce chevauchement est la base de l'interprétation de l'inhibition de la fonction stabilisatrice de MAP6 par la calmoduline qui provoquerait, en présence de calcium, un encombrement stérique sur MAP6, empêchant ainsi son interaction avec les microtubules.

### 7.3.3 Régulation de l'interaction de MAP6 avec le cytosquelette lors de sa phosphorylation par la CaMKII.

Lors de l'établissement de la séquence en acide aminé de MAP6, quatre sites potentiels de phosphorylation de MAP6 (P1 à P4) par la kinase CaMKII ("Ca<sup>2+</sup>/calmoduline dependent kinase II") ont été identifiés (Bosc et al., 1996). Ces sites se situent à l'intérieur de sites de liaison de MAP6 avec la calmoduline (Cam2, Cam4, Cam5 et Cam6) (Figure 16). La production d'anticorps spécifiques dirigés contre chacun des sites phosphorylés, a permis d'observer cette phosphorylation de MAP6 *in vitro* (sur les sites P1, P2 et P4) mais aussi *in vivo* (sur les sites P2 et P4) (Baratier et al., 2006). Lorsque l'on observe, dans des neurones hippocampaux en culture, la forme phosphorylée de MAP6 on remarque que celle-ci ne co-localise plus aussi bien avec le réseau de microtubules mais va par contre s'associer au réseau d'actine (Baratier, 2006). Dans cette même étude, des expériences de co-sédimentations montrent d'ailleurs cette perte d'interaction entre MAP6 et microtubules en faveur de MAP6 avec l'actine lorsque MAP6 est phosphorylée sur ces sites. Ainsi la phosphorylation de MAP6 par la CaMKII, tout comme son association avec le complexe Ca<sup>2+</sup>/calmoduline, vont détacher MAP6 du réseau microtubulaire. Baratier et ses collaborateurs montrent par ailleurs que cette phosphorylation de MAP6 peut être induite par un traitement de ces cultures de neurones hippocampaux avec du glutamate.



Ainsi l'activité synaptique de ces neurones aurait pour conséquence la relocalisation de MAP6 dans des régions enrichies en actine. Dans ces neurones en culture, cette sous-population de MAP6 phosphorylée co-localise, au moins partiellement, avec des protéines pré- et post-synaptiques comme Synapsin et Homer.

La CamKII est une enzyme clé de la plasticité synaptique (Fukunaga et al., 1996; Bayer et al., 2001). Celle-ci est activée de manière constitutive par autophosphorylation suite à son interaction préalable avec le complexe  $Ca^{2+}$ /calmoduline. On observe donc deux mécanismes distincts temporellement et permettant la délocalisation de MAP6 des microtubules. Le premier, a lieu directement après un influx de calcium, et consiste en l'interaction entre MAP6 et la calmoduline. Le second, à savoir la phosphorylation de MAP6 par la CamKII, se produit plus tardivement bien après le retour à la normale des niveaux de calcium locaux. Ce second mécanisme perdurerait vraisemblablement plus longtemps, jusqu'à ce que la CamKII retourne dans un état non activé constitutivement (Miller and Kennedy, 1986) et que MAP6 soit déphosphorylée. A travers cette signalisation on peut spéculer quant au rôle de MAP6 dans des événements dépendant d'influx de calcium tels que les mécanismes sous-jacents à la plasticité synaptique (LTP, LTD etc...). Il est intéressant de noter qu'en effet ces mécanismes sont déficients chez les souris KO MAP6 (Chapitre 7.4.3.2).

#### **7.3.4 Introduction de SL21 et adressage de MAP6 au Golgi par ses domaines de palmitoylation.**

La recherche dans des banques de données de protéines apparentées aux MAP6 a permis d'identifier SL21 ("STOP-like protein 21 kD") (Bosc et al., 2001). Cette protéine est aussi connue sous l'appellation MAP6d1 (MAP6 domain-containing protein 1). Elle contient une séquence de 35 aa N-terminaux ayant 83% d'homologie avec la portion N-terminale des E- et N-MAP6. Cette séquence comprend le motif Cam1 de liaison à la calmoduline caractérisé chez MAP6. De plus, un second domaine de SL21 de 24 aa partage 74% d'homologie avec le module de stabilisation des microtubules Mn3 de MAP6 (Gory-Fauré et al., 2006) (Figure 16). Gory et al. ont démontré que cette protéine est exclusivement exprimée dans le cerveau et en post-natal chez la souris. Elle se co-localise avec l'appareil de Golgi mais aussi avec des structures Golgiennes dendritiques nommée "Outposts" de Golgi dans les neurones hippocampaux en culture.

Cette localisation de SL21 au Golgi est permise par la présence de 3 résidus cystéines en N-terminal (acides aminés 5, 10 et 11) entourés de résidus basiques. Ces résidus constituent effectivement des sites de fixation d'acides gras, les palmitates. Et c'est cette palmitoylation de SL21 qui permet son encre aux membranes Golgiennes (Gory-Fauré et al., 2014). De plus, les enzymes Palmitoyl-acyltransférases à domaine DHHC 2, 3, 7, 15 et 21 sont capables de palmitoyer SL21 lorsqu'elles sont co-transfectées dans un système hétérologue (HEK 293). De façon moins prononcée, les isotypes 6, 10, 12, 14 et 20 palmitoylent aussi SL21. D'autre part, tout comme MAP6, la présence du module Mn de SL21 lui confère des propriétés stabilisatrices des microtubules au froid et aux drogues dépolymérisantes (nocodazole) (Gory-Fauré et al., 2006).

Les MAP6 neuronales N et E possèdent toutes deux les mêmes sites de palmitoylation que SL21. En effet, lorsque que l'on transfecte la N-MAP6 en faible quantité dans des cellules 3T3 NIH, celle-ci se co-localise avec un marquage anti-GM130 du Golgi (Gory-Fauré et al., 2006). A l'instar de SL21, cette localisation Golgienne de MAP6 est dépendante de sa palmitoylation N-terminale (Gory-Fauré et al., 2014).

Une étude très récente a montré que MAP6 s'associe à des vésicules sécrétrices dans des neurones hippocampaux non polarisés (Tortosa et al., 2017). En revanche, elle va se localiser de manière plus stable au niveau de la portion proximale de l'axone lors de l'initiation de la polarisation du neurone. Elle stabiliserait alors la dynamique des microtubules. D'autre part MAP6 semble importante dans le transport mitochondrial dépendant de la kinésine-1 au niveau de l'axone. L'ensemble de ces données tend à suggérer l'importance de MAP6 dans la polarisation neuronale et la détermination de l'axone. L'utilisation de shRNA dirigés contre MAP6 va d'ailleurs altérer cette polarisation. Enfin Tortosa et al. montrent que cette fonction neuronale de MAP6 nécessite la coupure de ses palmitates par l'enzyme  $\alpha/\beta$ -Hydrolase domain-containing protein 17 (ABHD17B) (Tortosa et al., 2017). Des travaux antérieurs au sein du laboratoire avait montré l'importance de cette palmitoylation pour l'adressage subcellulaire de MAP6 (Gory-Fauré et al., 2006, 2014). Cependant cette dernière étude met en lumière pour la première fois l'importance de la palmitoylation de MAP6 dans la maturation des neurones hippocampaux.

### 7.3.5 Rôle des domaines riches en proline dans l'interaction de MAP6 avec d'autres protéines.

MAP6 possède deux sites en tandem riches en proline correspondant à des sites putatifs de liaison à des protéines à domaine SH3 (Srk Homology 3) (Bosc et al., 1996). Cependant, le rôle de ces domaines d'interaction est longtemps resté obscur. L'analyse en spectrométrie de masse de l'interactome de la protéine Intersectin 1 (ITSN1) a permis l'identification de MAP6 comme un de ses partenaires (Morderer et al., 2012). Cette interaction est retrouvée en co-immunoprécipitation à partir de lysats de cerveaux totaux, à la fois en utilisant des anticorps dirigés contre l'ITSN1 et contre MAP6. Des expériences de pull-down à partir de différents domaines SH3 de l'ITSN1 purifiés montrent que cette interaction passe par le domaine SH3A. Enfin ITSN1 et MAP6 se co-localisent, en culture, au niveau des neurites de neurones hippocampaux ainsi que de leur soma (Morderer et al., 2012).

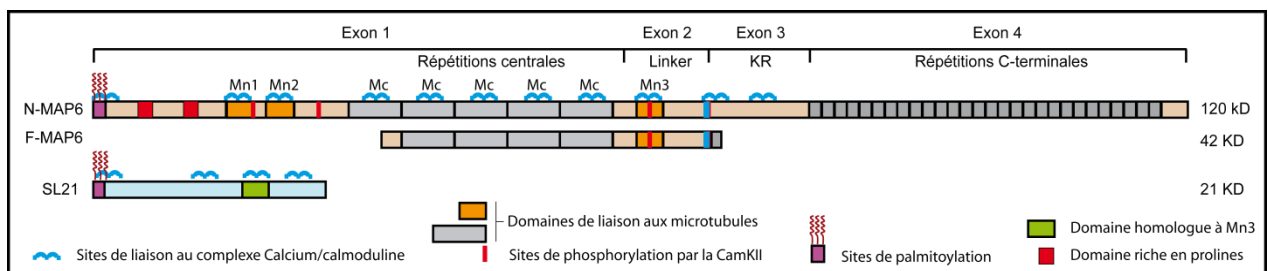


Figure 16 : Représentation schématique de N-MAP6 et SL21 et de leurs domaines fonctionnels identifiés.

### 7.3.6 Autres interactions fonctionnelles connues de MAP6

BMCC1 (Bcl2, the adenovirus E1B 19 kDa interacting protein 2 and the Cdc42 GAP homology BCH motif-containing molecule at the carboxy-terminal region 1) est une protéine de 390kD importante dans de nombreux mécanismes cellulaires impliquant de petites Rho GTPases, tels que l'apoptose. Cette protéine est par ailleurs maintenant utilisée pour le pronostic de neuroblastomes (Machida et al., 2006). L'identification des partenaires de BMCC1s, une isoforme cérébrale de BMCC1, a conduit à MAP6. En effet BMCC1s est capable d'interagir directement avec les isoformes E et N-MAP6 mais pas la F-MAP6 à la fois *in vitro* et *in vivo* (Arama et al., 2012). Arama et al. montrent par ailleurs qu'en présence de BMCC1s l'isoforme N-MAP6 n'est plus capable de stabiliser les microtubules à 4°C *in vitro*.

Cette capacité stabilisatrice n'est, en revanche, pas affectée chez la F-MAP6 qui n'interagit pas avec BMCC1s. Enfin les auteurs montrent que, à l'instar de la phosphorylation de MAP6 par la CaMKII, son interaction avec BMCC1s semble délocaliser MAP6 des microtubules. Dans des neurones corticaux en culture cette délocalisation de MAP6 induit une augmentation du nombre et de la taille des neurites.

TMEM106B, un facteur de risque pour le développement de dégénérescences du lobe fronto-temporal, est une protéine transmembranaire originellement associée aux endosomes tardifs et aux lysosomes (Schwenk et al., 2013). Cette protéine interagit, elle aussi, avec MAP6 au niveau de ses répétitions C-terminales. En culture primaire de neurones de rat, Schwenk et al. montrent que l'inhibition de l'expression de TMEM106B, tout comme la surexpression de MAP6, a pour effet une augmentation du transport antérograde et rétrograde des lysosomes dans les dendrites (Schwenk et al., 2013). Ce phénotype est associé à une diminution de l'arborisation dendritique de ces neurones. D'autre part, l'inhibition de l'expression de MAP6, dans le contexte d'une inhibition au préalable de l'expression de TMEM106B, va rétablir ce transport lysosomal ainsi que la quantité d'arborisations dendritiques (Schwenk et al., 2013). Enfin les auteurs démontrent l'implication directe du transport lysosomal dans la formation de l'arborisation dendritique. Ces données leur permettent d'établir la théorie selon laquelle MAP6 serait un frein au transport lysosomal en fixant les lysosomes au cytosquelette microtubulaire via son interaction avec TMEM106B.

## 7.4 La souris KO MAP6

### 7.4.1 Génération de la souris KO MAP6 et fond génétique

Afin d'étudier la fonction intégrée de MAP6 chez l'animal, des souris invalidées pour le gène codant les protéines MAP6 (KO MAP6) ont été produites au laboratoire (Andrieux et al., 2002). Pour cela, l'exon 1 du gène *Map6* a été remplacé, par recombinaison homologue, par une cassette contenant un gène rapporteur ( $\beta$ -galactosidase) sous le contrôle du promoteur endogène des N- et E-MAP6. Les souris homozygotes ainsi générées sont viables et n'expriment plus aucune isoforme de MAP6.

## 7.4.2 Implications de MAP6 sur la neuro-anatomie des souris

### 7.4.2.1 Morphologie du cerveau des souris KO MAP6

Les souris KO MAP6 présentent des défauts neuro-anatomiques disparates en fonction des régions cérébrales. Tout d'abord, on remarque une hypoplasie cérébrale associée à un important élargissement des ventricules latéraux (Powell et al., 2007). Powell et al. observent par ailleurs que cette hypoplasie affecte uniquement certaines régions cérébrales telles que le striatum, le noyau thalamique ou encore le cortex, alors que d'autres régions, comme l'hippocampe, ne sont pas affectées. D'autre part, il a été mis en évidence des défauts de maturation des bulbes olfactifs des souris KO MAP6. En effet celles-ci présentent à P6 une diminution de la taille des glomérules olfactifs associée à une augmentation de leur nombre par rapport aux souris sauvages (Richard et al., 2009). Enfin une étude montre une diminution du nombre de fibres axonales sérotoninergiques, issues des noyaux du raphé, non corrélée à une diminution du nombre de somas au sein de ces noyaux (Fournet et al., 2010). Cette observation laisse supposer un défaut de croissance axonale de ce type de neurone.

### 7.4.3 Implications de MAP6 sur la physiologie des cellules neuronales

L'étude des phénotypes cellulaires de ces souris KO MAP6 par différents laboratoires a permis d'identifier de nombreuses modifications métaboliques, synaptiques, mais aussi des niveaux d'expression génique.

#### 7.4.3.1 Altérations métaboliques

Tout d'abord, le métabolisme du glucose cérébral de ces souris est significativement augmenté dans certaines régions incluant le cortex olfactif, l'hypothalamus, l'aire tegmentale ventrale et la substance noire compacte (Hanaya et al., 2008). De plus, le niveau de corticostérone plasmatique, hormone communément associée au stress, est augmenté au niveau basal chez les souris KO MAP6. Même si ces souris sont toujours capables de voir leur niveau de corticostérone plasmatique augmenter suite à un stress modéré (injection saline), la variation observée par rapport au niveau basal est nettement plus faible que chez les souris sauvages (59% contre 159% d'augmentation) (Fournet et al., 2012a).

#### 7.4.3.2 Hypoglutamatergie hippocampale

Au niveau synaptique, les souris KO MAP6 présentent des défauts de neurotransmission. En effet, l'analyse au niveau de l'hippocampe de l'ultrastructure synaptique des neurones de la couche *stratum radiatum* du CA1 montre une diminution de moitié des vésicules pré-synaptique de ces neurones glutamatergiques (Andrieux et al., 2002). Associée à cela, une diminution du taux de glutamine au niveau du cerveau total a été noté chez ces souris (Brenner et al., 2007). Cette hypoglutamatergie est corrélée à des défauts de plasticité synaptique. Des expériences d'électrophysiologie ont ainsi montré une altération de la potentialisation et de la dépression à long terme (LTP, LTD) (Andrieux et al., 2002, 2006). Enfin, les taux d'ARNm de certaines protéines pré- et post-synaptiques sont diminués au niveau de l'hippocampe chez les souris KO MAP6, possiblement subséquent à une perte de densité synaptique (Eastwood et al., 2007).

#### 7.4.3.3 Hyperdomaminergie

Il a aussi été observé que l'absence de MAP6 induit une augmentation de la quantité de dopamine relarguée au niveau du noyau accumbens après une stimulation à haute fréquence (15 à 50 Hz) (Brun et al., 2005) alors qu'aucune différence significative n'est observée dans le striatum. Au niveau striatal, on observe tout de même une tendance allant vers plus de dopamine au niveau basal mais le ratio (niveau basal/relargage après stimulation) reste similaire aux souris sauvages. Associée à cette hyperdopaminergie du noyau accumbens, il est observé une diminution du taux de récepteurs D2 et D3 dans le striatum et le noyaux accumbens, alors que la densité de transporteur DAT (Dopamine Active Transporter) n'est pas affectée (Bouvrais-Veret et al., 2008). Enfin, la mesure de capture de dopamine radiomarquée au niveau de synaptosomes, indique une déficience de recapture au niveau du noyau accumbens mais pas au niveau du striatum (Bouvrais-Veret et al., 2008).

#### 7.4.3.4 Altération du transport axonal

A travers une étude du transport du manganèse ( $Mn^{2+}$ ) en MEMRI (Manganese-Enhanced Magnetic Resonance Imaging), Daoust et al. ont montré que le transport de ce cation est déficient chez les souris KO MAP6.

Ce phénotype reflète vraisemblablement un défaut de transport axonal ainsi que de transmission synaptique puisque cette déficience est accentuée lors du transport du  $Mn^{2+}$  dans un réseau polysynaptique.

#### 7.4.3.5 Altération des mécanismes d'autophagie

Une étude récente a montré que les souris hétérozygote pour MAP6 sont déficientes en protéine Beclin1 au niveau de l'hippocampe (Merenlender-Wagner et al., 2014). Cette altération est aussi observée au niveau de l'expression des ARNm de cette protéine ainsi que pour deux autres ARN qui lui sont associées (Adnp et Adnp2). Cette protéine Beclin1 est impliquée dans la régulation des mécanismes d'autophagie en recrutant des membranes pour la formation d'auto-phagosomes. Une autre étude ultra-structurale de microscopie électronique montre, qu'en l'absence de MAP6, les glomérules olfactifs présentent des altérations pré-synaptiques caractérisées par l'apparition de structures similaires à des vésicules d'autophagie (Benardais et al., 2010).

Ajouté aux travaux de Morderer sur l'interaction entre MAP6 et ITSN1 ainsi que ceux de Tortosa sur le transport vésiculaire dépendant de la kinésine-1 et de MAP6 (Morderer et al., 2012; Tortosa et al., 2017), il apparait maintenant que MAP6 est clairement impliquée dans la régulation de trafiques vésiculaires.

#### 7.4.4 **Le comportement des souris KO MAP6**

Les souris KO MAP6 présentent des troubles comportementaux pouvant être répertoriés en trois types : les troubles positifs, négatifs et cognitifs.

Parmi les troubles positifs, on observe notamment une hyperactivité locomotrice de ces souris à la fois basale et en réponse à un stress aigu tel que l'injection d'amphétamines (Brun et al., 2005; Begou et al., 2007; Powell et al., 2007). Ceci est associé à un fractionnement de leur activité, c'est à dire une augmentation du nombre de transitions entre différentes activités (locomotion, toilettage, sommeil, prise de nourriture etc...) (Andrieux et al., 2002, 2006).

Parmi les troubles négatifs, on retrouve une altération du comportement maternel de ces souris (Andrieux et al., 2002). En effet les mères présentent un désintérêt flagrant pour la constitution d'un nid, ainsi que pour les souriceaux nouvellement nés. Ceci induit une mortalité totale des nouveaux nés durant les 48 premières heures de leur vie.

Ce retrait social des souris KO MAP6 est aussi mis en évidence par leur faible performance au test de l'intrus anesthésié (Andrieux et al., 2002; Bégou et al., 2008; Delotterie et al., 2010) ainsi que par la diminution de leur agressivité lors de la rencontre entre deux males (Andrieux et al., 2002). Enfin, une anhédonie caractérise ces souris dans le test de préférence au sucrose (Fournet et al., 2012b).

La caractérisation de l'état d'anxiété des souris KO MAP6 est controversée, une étude montre que ces souris paraissent plus anxieuses dans le test de la boîte claire-obscur (Andrieux et al., 2002). Cependant dans le test d'enfouissement des billes, les souris KO MAP6 ont un score d'enfouissement diminué. Cela pourrait suggérer un effet anxiogène des billes moins fort chez ces souris (Delotterie et al., 2010).

Enfin les souris KO MAP6 présentent aussi des troubles cognitifs. Par exemple, elles ont des déficits dans le filtrage sensorimoteur tels qu'une diminution de l'inhibition motrice successive à un pré-stimulus sonore (Fradley et al., 2005). Enfin on note de nombreuses altérations des capacités d'apprentissage de ces souris. Ces déficiences touchent à la fois la mémorisation motrice comme le montre le test du rotarod (Fradley et al., 2005), ou encore la mémoire de travail spatial comme démontré par le test de la piscine de Morris (Bouvrais-Veret et al., 2007) ou le test d'apprentissage spatial guidé par l'olfaction (Bégou et al., 2008). On peut aussi noter des défauts de mémorisation à court et/ou long terme. En effet, lors du test de reconnaissance d'un nouvel objet, les souris KO MAP6 ne s'habituent pas à la nouveauté et maintiennent une exploration de l'objet familier quand les souris WT présentent une claire préférence exploratoire vers le nouvel objet au détriment du familier (Fournet et al., 2012b). Des défauts de mémoire sociale sont aussi apparents chez ces souris, comme le montre le test de l'introduction répété d'un intrus anesthésié (Volle et al., 2013).

#### **7.4.5 Effets des antipsychotiques chez la souris KO MAP6**

Le traitement chronique des souris KO MAP6 avec des anti-psychotiques typiques (halopéridol, chlorpromazine), permet de restaurer en partie de nombreux phénotypes observés chez ces souris. Ainsi ces traitements vont améliorer à la fois le comportement maternel, l'hyperactivité locomotrice, l'apprentissage spatial, l'interaction sociale (Andrieux et al., 2002; Brun et al., 2005; Bégou et al., 2008; Delotterie et al., 2010).



Associées à ces améliorations comportementales des données électrophysiologiques montrent des améliorations de la plasticité synaptique à court terme au niveau de l'hippocampe (Andrieux et al., 2002). De plus un traitement chronique des souris KO MAP6 avec des anti-psychotiques atypiques cette fois-ci (clozapine ou rispéridone) induit des améliorations de plasticité synaptique hippocampale à long terme (LTP) associées à des améliorations comportementales au niveau de l'hyperactivité mais aussi des niveaux d'anxiété chez ces souris (Fradley et al., 2005; Delotterie et al., 2010; Merenlender-Wagner et al., 2010).

#### 7.4.6 Effets de l'épothilone D chez la souris KO MAP6

L'épothilone D est un analogue du taxol qui interagit directement avec la tubuline et qui a pour effet de stabiliser les microtubules. Cette drogue possède, à la différence du taxol la capacité de passer la barrière hémato-encéphalique (Nettles et al., 2004; Wang et al., 2005).

Cette drogue améliore différents troubles comportementaux des souris KO MAP6 tels que le déficit de soins maternels, la fragmentation de l'activité spontanée ainsi que la mémorisation à court terme dans le test de reconnaissance d'un nouvel objet (Andrieux et al., 2006; Fournet et al., 2012a). L'épothilone D améliore également le nombre de vésicules glutamatergiques hippocampales tout en restaurant la plasticité synaptique à court et à long terme chez les souris KO MAP6 (PTP et LTP) (Andrieux et al., 2006). Enfin les déficits de transport axonal du manganèse observé par Daoust et al. sont aussi améliorés après le traitement de ces souris avec de l'épothilone D (Daoust et al., 2014).

Il est intéressant d'observer que la seule compensation de l'activité régulatrice des microtubules de MAP6 permet d'améliorer certains déficits cellulaires et comportementaux induits par l'inactivation de MAP6 chez les souris. Ceci dénote clairement l'importance de la régulation de la dynamique des microtubules dans ces déficits. Allant dans ce sens, des études sur le comportement des souris partiellement invalidées de MAP6 (hétérozygotes MAP6), traitées chroniquement avec un peptide (Davunetide) ont été réalisées. Ce peptide est lui aussi impliqué dans la stabilisation des microtubules, et il améliore les déficits d'hyperactivité, et de mémorisation des souris hétérozygotes MAP6 (Merenlender-Wagner et al., 2010; Gozes, 2011).

#### 7.4.7 **Les souris KO MAP6, un modèle d'étude de pathologies psychiatriques reconnu**

La validation d'un modèle animal pour l'étude de pathologies humaines s'effectue généralement au regard de trois grands critères : la reproduction des symptômes, la réponse commune (entre animal et homme) aux traitements médicamenteux, et enfin l'étiologie de la pathologie, c'est-à-dire la correspondance des mécanismes causant la pathologie avec ceux impliqués dans l'induction du modèle.

L'ensemble des études menées sur les souris KO MAP6 ont permis de faire accepter cette lignée par la communauté scientifique comme un modèle pour l'étude de la schizophrénie humaine. En effet, ces souris récapitulent de nombreux troubles comportementaux pouvant être comparés aux différentes dimensions de la schizophrénie (symptômes positifs, négatifs, cognitifs). De plus, ces souris valident le critère de prédiction à travers l'amélioration de leurs symptômes par les traitements neuroleptiques. Enfin, l'étiologie de la schizophrénie humaine présente des similitudes avec certains phénotypes des souris KO MAP6. On peut citer par exemple, la diminution de l'expression de certains ARNm retrouvée chez les patients schizophrènes et les souris KO MAP6 (Webster et al., 2001; Eastwood et al., 2007), l'altération des mécanismes d'autophagie observée à la fois sur ce modèle et chez dans la pathologie humaine (Merenlender-Wagner et al., 2014; Schneider et al., 2017), ainsi qu'un polymorphisme du gène *MAP6* chez une famille japonaise atteinte de schizophrénie (Shimizu et al., 2006). Par ailleurs, des perturbations de la neurotransmission glutamatergique (Benes et al., 1992; Akbarian et al., 1996) ainsi qu'une hypodopaminergie (Remington et al., 2011; Rice et al., 2016; Weinstein et al., 2017) ont aussi été observées chez les patients schizophrènes. Ces considérations étiologiques de la schizophrénie portent, pour ce modèle, sur les causes génétiques de la pathologie. Il faut toutefois garder à l'esprit que le spectre des pathologies schizoïdes peut avoir de multiples causes génétiques mais aussi environnementales et comportementales (consommation de drogues...). Bien évidemment la simplification d'une pathologie psychiatrique humaine à un modèle animal implique une perte d'information sur l'ensemble des composantes de la pathologie.

En revanche, cette modélisation permet d'utiliser ce genre de modèle pour l'étude d'autres pathologies partageant des symptômes avec la schizophrénie. Ainsi les souris KO MAP6 ont aussi été utilisées pour l'étude de la dépression (Fournet et al., 2012b) ainsi que pour l'étude de traitements associés à la dépression comme l'électro-convulsivo-thérapie (données en cours de publication).

## 8 Les CRMPs

### 8.1 Historique

A l'origine, c'est en 1974 que Brenner identifie un gène, nommé *unc-33* chez *Caenorhabditis Elegans*, pour son importance dans les fonctions motrices de cet invertébré. Ce gène *unc-33* code pour un orthologue des CRMP. Ce n'est que 11 ans plus tard que Hedgecock et al. démontrèrent que ce gène est nécessaire à l'établissement des connexions axonales de neurones chemo- et mechano-senseurs chez *C. Elegans* (Hedgecock et al., 1985). Ils observent aussi une surabondance de microtubules axonaux chez la souche de *C. Elegans* mutante pour *unc-33* et proposent que ce gène puisse être nécessaire à la bonne formation du cytosquelette axonal, et ainsi contrôler l'orientation de la croissance axonale. En 1995, Minturn et al. identifient un orthologue de UNC-33 chez le rat qu'ils nomment TOAD-64 (Turn On After Division - 64kD) (Minturn et al., 1995a). Cet orthologue sera aussi décrit deux mois plus tard par Goshima et al. chez le poulet (Goshima et al., 1995). Ceux-ci démontrent alors, par des techniques d'électrophysiologie, l'implication de cette protéine dans la cascade de signalisation induite par la Collapsin1 (maintenant connue sous le nom de sémaphorine 3A). Ils nomment alors cette nouvelle protéine CRMP-62 (pour Collapsin Response Mediator Protein - 62kD maintenant nommée CRMP2) (Goshima et al., 1995). De plus, Goshima et al. démontrent l'importance de cette CRMP dans l'induction, par la sémaphorine 3A, du collapse des cônes de croissance de neurones de DRG (Dorsal Root Ganglia) de poulet en culture.

Depuis lors, la CRMP2 a été largement étudiée, permettant ainsi l'identification de quatre autres isoformes de cette protéine. De nombreuses caractéristiques de CRMP2 sont alors retrouvées chez les autres isoformes, qui présentent de fortes homologies de séquences avec CRMP2 (voir tableau ci-dessous). Ces cinq CRMP sont décrites dans la littérature sous différentes appellations en fonction de l'espèce animale chez qui elles sont étudiées. Ces différentes appellations sont récapitulées dans le tableau ci-dessous.

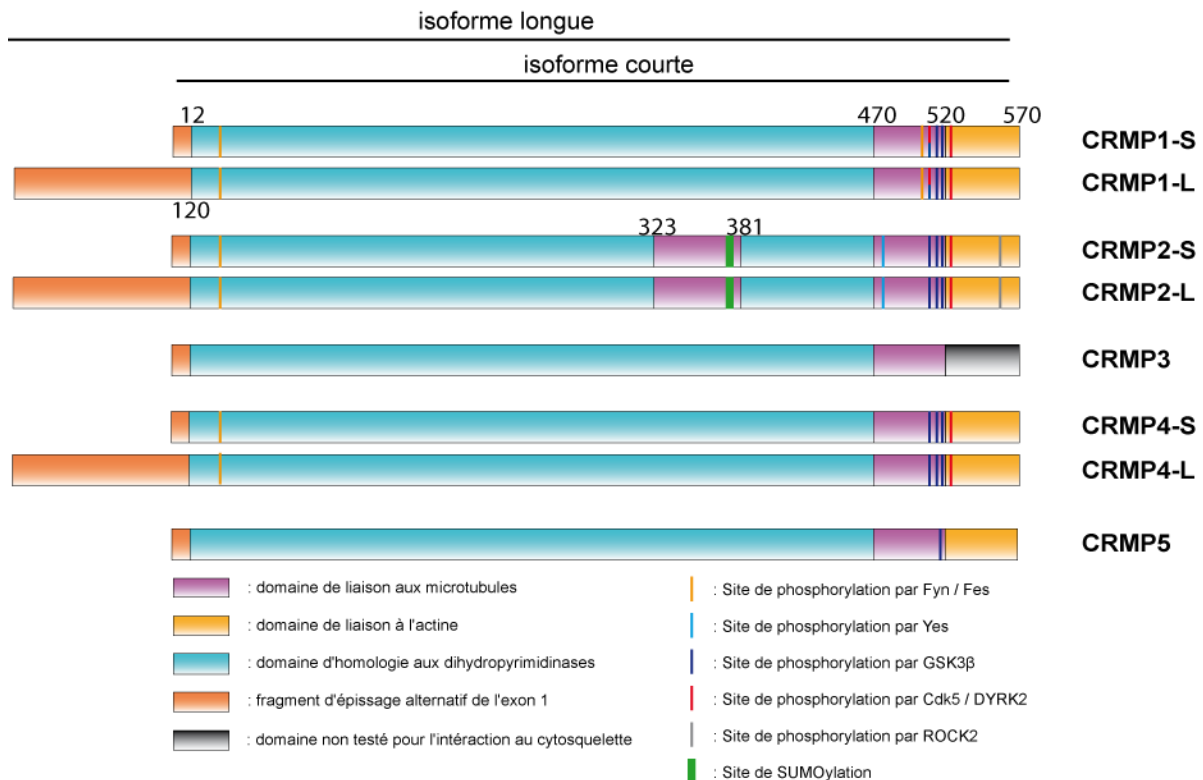
| Noms                                | Isoformes |         |        |         |        |
|-------------------------------------|-----------|---------|--------|---------|--------|
|                                     | 1         | 2       | 3      | 4       | 5      |
| Collapsin Response Mediator         | CRMP1     | CRMP2   | CRMP3  | CRMP4   | CRMP5  |
| Dihydropyrimidinase Like Protein    | DPYSL1    | DPYSL2  | DPYSL4 | DPYSL3  | DPYSL5 |
| Dihydropyrimidinase Related Protein | DRP1      | DRP2    | DRP4   | DRP3    |        |
| UNC-33 Like Phosphoprotein          | ULIP3     | ULIP2   | ULIP4  | ULIP1   | ULIP6  |
| TOAD64 / Ulip / CRMP                | TUC1      | TUC2    | TUC3   | TUC4    |        |
| Turn On After Division              |           |         |        | TOAD-64 |        |
| Collapsin Response Mediator Protein |           | CRMP-62 |        |         |        |
| CRMP Associated Molecule            |           |         |        |         | CRAM   |
| Homologie avec CRMP2                | 76%       |         | 75%    | 76%     | 50%    |

Tableau 2 : Nomenclature des CRMP et pourcentage d'homologie avec CRMP2.

## 8.2 Structure et diversité des CRMP

### 8.2.1 Homologie de séquence

Chez les Mammifères, les CRMP sont codées par 5 gènes différents (*crmp1* à 5). Les CRMP1 à 4 partagent 70 à 80% d'homologie. CRMP5 elle, ne partage que 50% d'homologie avec les autres isoformes (Charrier et al., 2003). Bien qu'elles n'aient pas conservé d'activité enzymatique, ces CRMP présentent tout de même environ 50% d'homologie de séquence avec l'enzyme dihydropyrimidinase (DHPase) du foie (Wang and Strittmatter, 1997; Quinn et al., 1999). Il semble que cette perte d'activité enzymatique soit due à la disparition au cours de l'évolution d'un résidu histidine crucial à la fixation de cations métalliques au sein du site actif (Holm and Sander, 1997). Cette homologie avec la DHPase est particulièrement observée dans la portion centrale de la séquence en acides aminés des CRMP (Hamajima et al., 1996) (Figure 17, bleu ciel).



**Figure 17 : Représentation schématique des différentes isoformes de CRMP, de leurs domaines identifiés ainsi que de leurs sites de modification post-traductionnelle.**

Adapté de (Uchida et al., 2009; Yamashita and Goshima, 2012).

### 8.2.2 L'épissage alternatif des CRMPs

Les gènes *CRMP* sont composés de 14 exons (Torres and Polymeropoulos, 1998; Kitamura et al., 1999). Malgré cela, un seul épissage alternatif de ces gènes a été identifié, aboutissant au remplacement de la première dizaine d'acides aminés N-terminaux de la protéine (Figure 17, orange foncé) par un fragment plus long (environ 110 aa). Cet épissage conduit à la formation de deux isoformes (une courte et une longue) chez les CRMP 1, 2 et 4 (Leung et al., 2002; Quinn et al., 2003; Yuasa-Kawada et al., 2003). Ce même épissage alternatif a été retrouvé chez le poulet pour CRMP3 (Yuasa-Kawada et al., 2003) mais ne semble pas exister chez les mammifères. Enfin, on ne retrouve que l'isoforme courte de CRMP5 (Yuasa-Kawada et al., 2003). De manière générale les isoformes courtes sont bien plus fortement exprimées que les longues (Leung et al., 2002; Alabed et al., 2007; Yoneda et al., 2012), et parmi les isoformes longues, celles des CRMP1 et 2 sont les mieux représentées (Quinn et al., 2003).

La fonction de l'ajout de cette portion N-terminal n'est pas encore complètement élucidée mais les études tendent à s'accorder sur une spécificité d'action des formes longues des CRMP1, 2 et 4 dans la modulation de la cascade de signalisation en aval de la GTPase RhoA (Leung et al., 2002; Alabed et al., 2010; Morgan-Fisher et al., 2013). (Chapitre 8.3.4)

### 8.2.3 Expression tissulaire

Toutes les CRMP sont très majoritairement exprimées au niveau du système nerveux des vertébrés (Wang and Strittmatter, 1996), aussi bien central que périphérique (Quinn et al., 1999). Dans le système nerveux central, on retrouve les CRMP1, 2, 4 et 5 dans toutes les régions cérébrales (Wang and Strittmatter, 1996; Quinn et al., 1999; Fukada et al., 2000; Ricard et al., 2001). CRMP4 a très tôt été observée comme fortement exprimée dans les neurones immatures (Minturn et al., 1995b). Cette protéine est depuis utilisée comme marqueur de ces neurones précoces (Seki, 2002; Tamura et al., 2007). Chez l'adulte, on retrouve ainsi CRMP4 enrichie dans les zones où la neurogenèse est encore présente ( la zone sous-ventriculaire et la couche granuleuse du gyrus denté de l'hippocampe), mais aussi le long des voies de migration de ces neurones néoformés (Rostral Migratory Stream ou RMS) et dans les structures où ces neurones s'établissent (les bulbes olfactifs dans le cas de la neurogenèse sous-ventriculaire) (Nacher et al., 2000; Liu and Martin, 2003; Liu et al., 2003).

Les ARNm des CRMP1 à 4 ont tous été retrouvés dans les oligodendrocytes matures et immatures, même si l'expression protéique n'est montrée, dans cette étude, que pour CRMP2. Aucun ARNm n'est en revanche retrouvé dans les astrocytes (Ricard et al., 2000). Plus récemment les protéines CRMP2 et 5 ont été observées colocalisées dans les oligodendrocytes où elles seraient, comme pour les neurones, impliquées dans des mécanismes de remodelages cyto-architecturaux (Ricard et al., 2001; Fernández-Gamba et al., 2012).

Bien qu'étant exprimées très majoritairement dans le système nerveux, une petite proportion de ces CRMP peut cependant être retrouvée dans d'autres tissus. Par exemple, CRMP4 a la particularité d'être exprimée dans les cellules souches stromales de la moelle osseuse (Abdallah et al., 2016).

La présence d'une petite quantité d'ARNm de CRMP2 (Quinn et al., 1999) et CRMP4 (Byk et al., 1998) est rapportée au niveau des poumons des souris et des rats mais aussi dans les muscles et reins de souris pour CRMP2 (Byk et al., 1998), sans qu'une fonction ne leur soit attribuée. L'expression des CRMP1, 4 (Taketo et al., 1997; Kato et al., 1998) et 5 (Ricard et al., 2001) a pu être observée dans les testicules et plus particulièrement au niveau des spermatides durant leur différenciation pour CRMP1 et 4. Enfin CRMP5 est aussi retrouvée dans les tissus musculaires chez le raton (Ricard et al., 2001).

L'expression des CRMP, est finement contrôlée dans le temps. Les CRMP sont ainsi particulièrement exprimées durant la période d'axonogenèse et de synaptogenèse. Ce pic d'expression périnatal est observé pour chacune d'entre elles, et l'expression de CRMP2 perdure jusqu'à l'âge adulte. Il en va de même pour CRMP3 mais uniquement au niveau du cervelet et de la couche moléculaire du gyrus denté de l'hippocampe (Wang and Strittmatter, 1996; Quach et al., 2008a). Ceci laisse supposer des fonctions spécifiques des CRMP2 et 3 chez l'adulte (Wang and Strittmatter, 1996; Byk et al., 1998; Charrier et al., 2003). Par ailleurs, il existe des différences de régulation temporelle des isoformes courtes et longues des CRMP. Ainsi, CRMP1-L est exprimée plus précocement (E12) dans les cerveaux de rat que son homologue courte (E15), à l'inverse de CRMP2 pour qui la forme longue apparaît beaucoup plus tardivement que la courte (autour du 15ème jour post-natale) (Quinn et al., 2003). Enfin l'isoforme longue de CRMP4 n'est exprimée que pendant une courte période de l'embryogénèse (E15 à E18) dans les cerveaux de rats (Quinn et al., 2003).

## 8.2.4 **Modification post-traductionnelles des CRMPs**

### 8.2.4.1 Les sites de phosphorylation des CRMP

Les études s'accordent sur l'importance de la phosphorylation des CRMP pour la régulation de leurs activités. De nombreuses kinases ciblant les CRMP ont été identifiées, notamment la Glycogen Synthase Kinase 3 $\beta$  (GSK3 $\beta$ ), la Cyclin-dependent kinase 5 (Cdk5), Dual Tyrosine-Regulated Kinase 2 (DYRK2) et Rho-associated kinase 2 (ROCK2) (Yamashita and Goshima, 2012). La plupart de ces phosphorylations ciblent la région C-terminale des CRMP (Figure 17).



GSK3 $\beta$  est une kinase originellement découverte pour sa fonction dans la synthèse du glycogène. Sous le contrôle de la signalisation découlant de la kinase Akt, elle est impliquée dans de nombreux processus comme le métabolisme, la différenciation, ou encore le neuro-développement (Hermida et al., 2017). La phosphorylation des CRMP par GSK3 $\beta$  est sans doute la plus largement étudiée. Elle cible les résidus Thréonine<sup>509</sup>, Thréonine<sup>514</sup> et Sérine<sup>518</sup> (Uchida et al., 2005; Yoshimura et al., 2005; Yamashita and Goshima, 2012) mais aussi Thréonine<sup>516</sup> pour CRMP5 (Brot et al., 2014). Cette modification est sous la dépendance d'une phosphorylation préalable sur la Sérine<sup>522</sup>. Cette phosphorylation préalable peut être réalisée par différentes kinases comme Cdk5 ou DYRK2 (Uchida et al., 2005; Cole et al., 2006; Tanaka et al., 2012; Morimura et al., 2013). Mise à part CRMP3, toutes les CRMP possèdent un site de phosphorylation par Cdk5 consensus au niveau de leur Sérine<sup>522</sup> (Uchida et al., 2005). CRMP1 en possède d'ailleurs un second au niveau de la Thréonine<sup>509</sup> (Uchida et al., 2005) (Figure 18).

ROCK2 est une kinase clef de la régulation du cytosquelette d'actine (Amano et al., 1996; Kimura et al., 1996). Elle partage, avec la CaMKII (Hou et al., 2009), une spécificité d'action sur le résidu Thréonine<sup>555</sup> de CRMP2 (Arimura et al., 2000, 2005). ROCK2 est aussi capable de phosphoryler CRMP1 (Leung et al., 2002).

D'autres sites de phosphorylation des CRMP sont plus brièvement décrits dans la littérature. Ainsi une phosphorylation de CRMP2 par la kinase Yes a lieu sur le résidu Tyrosine<sup>479</sup> (Varrin-Doyer et al., 2009). Un site de phosphorylation au niveau N-terminal de CRMP a aussi été identifié, il concerne le résidu tyrosine<sup>32</sup> qui est ciblé par Fyn et Fes (deux membres de la famille des kinases Src) (Sasaki et al., 2002; Yamashita et al., 2006; Uchida et al., 2009). Enfin Fyn phosphoryle aussi spécifiquement le résidu Tyrosine<sup>504</sup> de CRMP1 (Buel et al., 2010) (Figure 18).

La phosphorylation des CRMP permet de moduler leurs fonctions et en particulier leurs interactions avec leurs partenaires. Ce point va être développé dans les chapitres suivants (Figure 18).

#### 8.2.4.2 O-Glycosylation

La protéine CRMP2 est O-glycosylée au niveau du cytosol synaptosomal (Cole and Hart, 2001). Cette modification post-traductionnelle consiste en l'ajout d'un N-acétylglucosamine sur un résidu sérine ou thréonine. La simulation sur le serveur NetOGlyc prédit cette modification avec une forte probabilité au niveau C-terminal de la protéine (aa 500 à 540), sur la base de sa séquence et de l'accessibilité du domaine (Hansen et al., 1998). C'est pourquoi, il est proposé que cette modification puisse empêcher la phosphorylation de CRMP2 au niveau de cette région C-terminale, permettant un niveau supplémentaire de régulation de l'activité de cette protéine (Comer and Hart, 2000; Cole and Hart, 2001).

#### 8.2.4.3 SUMOylation

Une dérégulation de la SUMOylation de CRMP2 sur le résidu Lysine<sup>374</sup> engendre des perturbations de l'adressage membranaire de canaux voltage-dépendants (Ju et al., 2013; Dustrude et al., 2016) (Chapitre 8.3.5 et Figure 18). On retrouve ce site de SUMOylation sur l'ensemble des CRMP 1 à 5 (Ju et al., 2013). La phosphorylation de CRMP2 par Cdk5 est indispensable pour initier la SUMOylation et cette dernière semble importante dans la régulation de l'oligomérisation de CRMP2 (Baumann and Kursula, 2017).

#### 8.2.5 **Oligomérisation**

Les CRMP sont toutes enclines à former des hétéro-dimères et tétramères *in vivo* et sont capables, dans une plus faible mesure, d'homo-oligomérisation (Wang and Strittmatter, 1997). Peu d'études ont été réalisées sur les compositions préférentielles en CRMP des hétéro-tétramères. L'une d'entre elles a tout de même montré, par des expériences de double hybride et de co-immunoprécipitation, les différences d'affinité entre les CRMP. On observe que les CRMP2 oligomérisent préférentiellement avec CRMP3 au détriment de CRMP1 ou de l'homo-oligomérisation. Il en va de même pour l'oligomérisation de CRMP1 avec CRMP3 (Wang and Strittmatter, 1997). CRMP5 interagit préférentiellement avec les CRMP 2, 3 et 4 mais pas avec CRMP1 (Fukada et al., 2000).

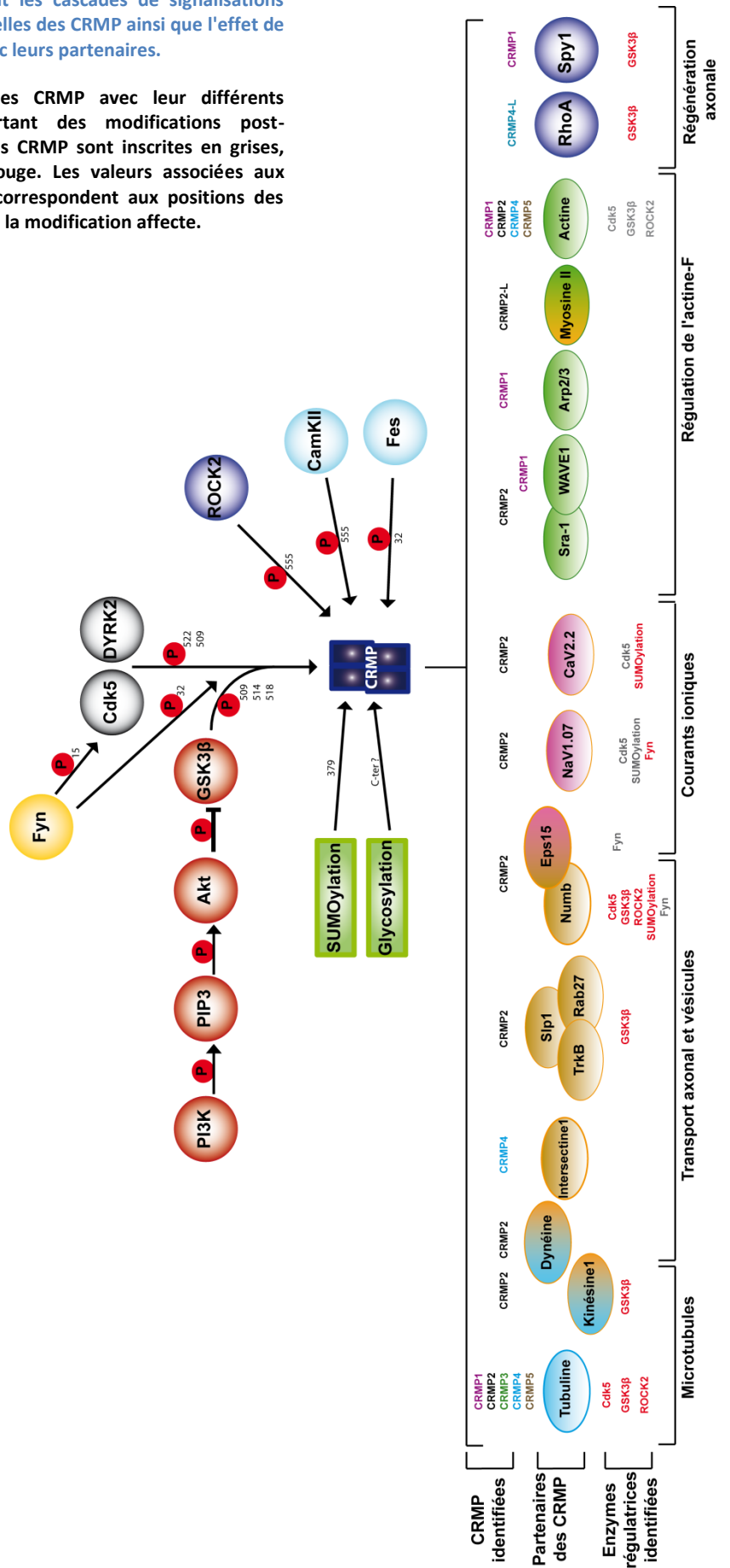
CRMP2 présente la particularité, *in vitro*, de former plus facilement des homo-tétramères en présence de Ca<sup>2+</sup> ou de Mg<sup>2+</sup> (Majava et al., 2008). A l'inverse, ces cations divalents auraient plutôt tendance à déstabiliser l'homo-tétramérisation des CRMP1 et 5 (Ponnusamy and Lohkamp, 2013).

Les oligomérisations sont aussi contrôlées par les niveaux de phosphorylations des CRMPs : seules les monomères non-phosphorylées (par CDK5 et GSK3 $\beta$ ) de CRMP2 et 4 oligomérisent avec les monomères de CRMP1 et 4 ou de CRMP1 et 2 respectivement. (Rembutsu et al., 2008). Enfin, sachant que la phosphorylation par Cdk5 favorise la SUMOylation de CRMP2 (Baumann and Kursula, 2017), et que ce site de SUMOylation n'est accessible que dans l'état monomère ou dimère de CRMP2 (Myllykoski et al., 2017), on peut imaginer que cette modification post-traductionnelle puisse aussi contribuer à réguler la tétramérisation.

Une théorie intéressante émerge de ces observations. Il est possible que les effets parfois antagonistes des CRMP (Brot et al., 2010) puissent permettre d'inhiber leurs activités via leur hétéro-oligomérisation. Ainsi, en présence de facteurs régulateurs de ces interactions entre CRMP (comme le Ca<sup>2+</sup> ou Mg<sup>2+</sup>), les homo-oligomérisations seraient alors favorisées, permettant à l'isoforme d'avoir son activité (Petratos and Lee, 2013). On peut citer l'exemple de l'adressage membranaire des canaux sodiques voltages dépendants (NaV) qui est favorisée par la forme SUMOylée, et donc non tétramérique de CRMP2 (Dustrude et al., 2016).

Figure 18 : Schéma non exhaustif récapitulant les cascades de signalisations aboutissant aux modifications post-traductionnelles des CRMP ainsi que l'effet de ces modifications sur l'interaction des CRMP avec leurs partenaires.

Ces modifications vont moduler l'affinité des CRMP avec leur différents partenaires présentés. Les enzymes apportant des modifications post-traductionnelles stimulant l'interaction avec les CRMP sont inscrites en grises, lorsqu'elles vont l'inhiber sont inscrites en rouge. Les valeurs associées aux phosphorylations ("P" dans un cercle rouge) correspondent aux positions des acides aminés des formes courtes des CRMP que la modification affecte.



## 8.3 Fonctions cellulaires des CRMP

### 8.3.1 Modulation du cytosquelette

#### 8.3.1.1 Liaison aux microtubules

La caractérisation des fonctions des CRMP a rapidement mené à l'identification de leur capacité de liaison aux microtubules. En effet, des expériences de pull-down montrent que toutes les CRMP (1 à 5) interagissent directement avec la tubuline purifiée ou dans des lysats de cerveaux (Fukata et al., 2002; Brot et al., 2010; Ji et al., 2014). Cette liaison permet à certaines CRMP (1, 2 et 4) d'agir directement sur les microtubules en les stabilisant tout en favorisant leur polymérisation (Fukata et al., 2002; Lin et al., 2011; Khazaei et al., 2014). Pour CRMP3, à l'inverse, cette interaction va inhiber la polymérisation des microtubules (Aylsworth et al., 2009). Enfin, malgré sa liaison aux microtubules, CRMP5 semble ne pas avoir d'effet stabilisateur des microtubules *in vitro* (Brot et al., 2010). De nombreuses études ont montré l'interaction entre CRMP et microtubules *in vitro* et en culture, ainsi qu'un effet des CRMP sur l'assemblage *in vitro* de ces microtubules. Cependant aucune étude de l'effet des CRMP sur la dynamique globale des microtubules n'a été réalisée (vitesse de polymérisation/dépolymérisation, taux de catastrophe et de sauvetage).

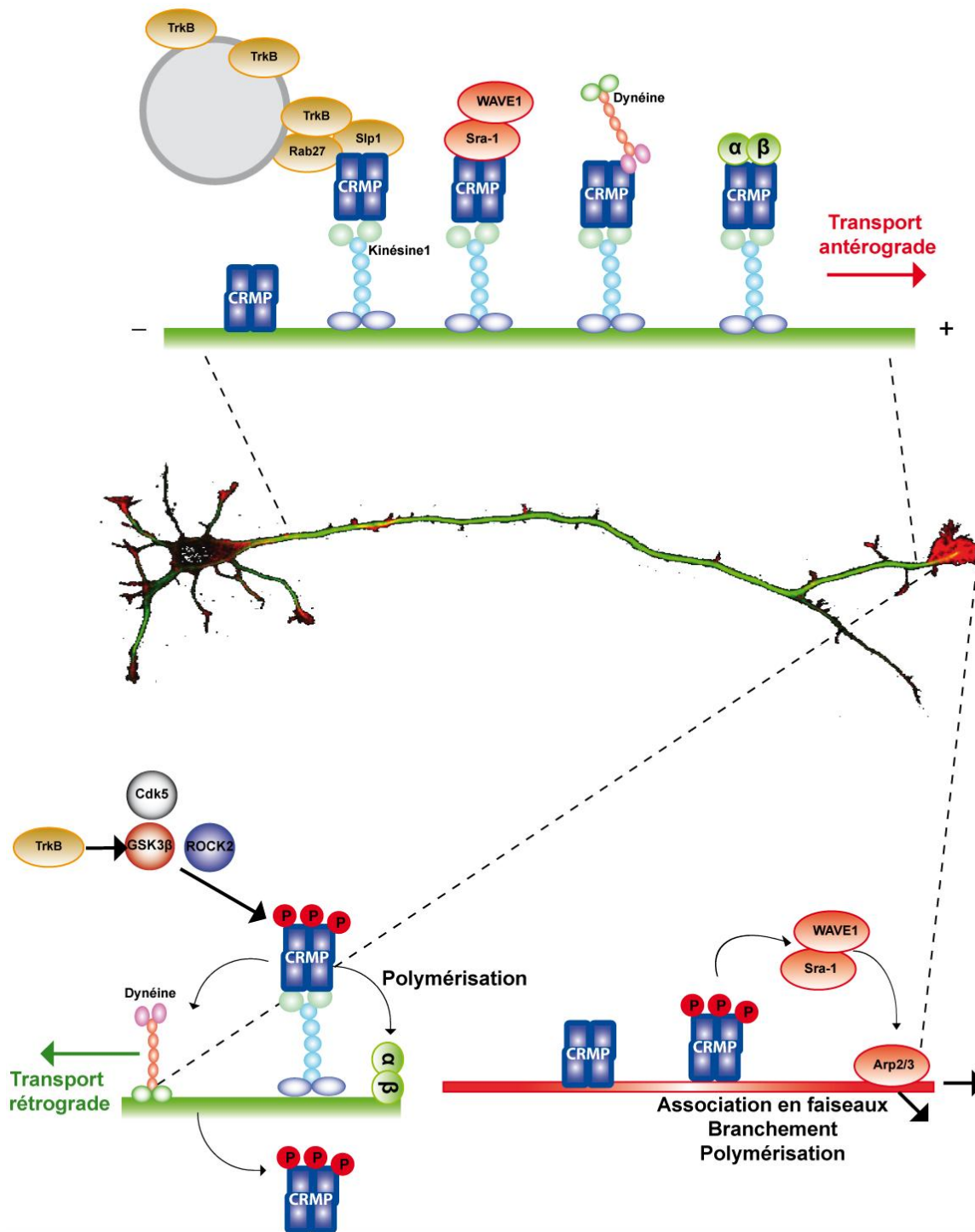
Les travaux publiés par le laboratoire de Kaibuchi, et en particulier ceux portant sur CRMP2, tendent vers une théorie originale. En effet les auteurs, montrent que CRMP2 interagit préférentiellement *in vitro* avec les dimères de tubuline plutôt qu'avec les microtubules polymérisés (Fukata et al., 2002). En s'appuyant sur le fait que CRMP2 favorise la polymérisation des microtubules, ils spéculent alors que c'est grâce à sa liaison avec les dimères de tubuline que CRMP2 permettrait de faciliter l'assemblage des microtubules. Ils parlent alors d'une co-polymérisation des microtubules avec CRMP2. Les auteurs déterminent aussi pour la première fois un domaine de CRMP (aa 323 à 381) nécessaire à son activité sur l'assemblage des microtubules *in vitro* (Figure 19).

#### 8.3.1.2 Liaison à l'actine

L'interaction entre CRMP et actine a été étudiée par différents laboratoires pour toutes les CRMP sauf l'isoforme 3 (Arimura et al., 2005; Rosslenbroich et al., 2005; Khazaei et al., 2014; Tan et al., 2015; Cai et al., 2016; Gong et al., 2016; Yu-Kemp and Brieher, 2016). Le domaine impliqué dans cette interaction a été caractérisé chez CRMP4 et correspond aux 50 acides aminés C-terminaux (470 à 520) (Khazaei et al., 2014; Cha et al., 2016).

CRMP1 et CRMP4 interagissent directement avec l'actine-F (Khazaei et al., 2014; Yu-Kemp and Brieher, 2016). CRMP4 va ainsi stimuler la formation de faisceaux d'actine *in vitro* (Rosslenbroich et al., 2005; Khazaei et al., 2014). Ceci va conduire, *in vivo*, au remodelage du cône de croissance en favorisant la formation de filopodes (Khazaei et al., 2014). De son côté CRMP1 va promouvoir le branchement de l'actine-F en présence de Arp2/3 et de son activateur ActA *in vitro* (Yu-Kemp and Brieher, 2016). En culture de cellules cancéreuses (DU145), l'utilisation d'ARN interférant avec CRMP1 augmente la formation de filaments d'actine (Cai et al., 2016).

Aucune interaction directe entre actine et CRMP2 n'a pu être démontrée. Leur interaction passerait sans doute par un complexe entre CRMP2/Sra1/actine (Arimura et al., 2005; Kawano et al., 2005). CRMP2 servirait alors plutôt au transport du complexe "specifically Rac1-associated protein 1" (Sra-1)/"WASP family verprolin- homologous protein 1" (WAVE1) au niveau de cône de croissance, où il stimulerait la polymérisation de l'actine via son action sur Arp2/3 (Kawano et al., 2005) (Figure 19 et chapitre suivant).



**Figure 19 : Récapitulation des mécanismes impliquant les CRMP et le cytosquelette dans la croissance axonale.**

La kinésine-1 est présente uniquement dans l'axone. CRMP2 interagit avec la kinésine-1 et va servir de protéine adaptatrice pour le transport antérograde de différents cargo tels que la dynéine, les dimères de tubuline, le complexe Sra-1/WAVE-1...

Une fois arrivée au cône de croissance, les phosphorylations des CRMP vont moduler leurs interactions avec leurs partenaires permettant ainsi leurs effets sur la croissance axonale.

En vert : microtubules, en rouge : actine.

### 8.3.2 Transport axonal et vésicules

CRMP2 interagit avec la chaîne légère (KLC1) du moteur moléculaire spécifique de l'axone, kinésine 1 (Kawano et al., 2005; Kimura et al., 2005; Arimura et al., 2009b). Les expériences de pull-down montrent que cette interaction a lieu au niveau C-terminal de CRMP2 (aa 440 à 572). La délétion de ce domaine induit une délocalisation de CRMP2 qui est moins présente à l'extrémité axonale. Ceci va se traduire, en culture, par une diminution de la croissance axonale. Cette observation est par ailleurs confortée par le fait que la mutation de l'orthologue de la kinésine1, délocalise UNC-33 (orthologue des CRMP) des axones chez *C.Elegans* (Tsuboi et al., 2005). Par l'intermédiaire de KLC1, CRMP2 va jouer le rôle de protéine adaptatrice pour le transport antérograde de cargos vers le cône de croissance.

On retrouve notamment le transport du complexe Sra1/WAVE1 (Kawano et al., 2005). Une interaction directe entre CRMP2 et la chaîne lourde de la dynéine a aussi été observée. Elle permettrait de bloquer les fonctions motrices de la dynéine. D'après les auteurs ceci induirait le transport antérograde de la dynéine au cône de croissance (Arimura et al., 2009a). Les auteurs montrent de plus que cette interaction est aussi possible entre la dynéine et les CRMP 1, 3 et 4. Plus récemment une étude a montré que CRMP2 forme un complexe *in vivo* et *in vitro* avec Slp1 et Rab27 (Arimura et al., 2009b). Les auteurs montrent alors que ces interactions, vont permettre le transport antérograde de vésicules contenant TrkB (Tyrosine Recepteur Kinase B), un récepteur du facteur de croissance BDNF (Brain Derived Neurotrophic Factor).

Enfin CRMP2 médie aussi le transport de dimères de tubulines au niveau des cônes de croissances (Kimura et al., 2005; Tsuboi et al., 2005). Les auteurs montrent, en effet, que l'interaction *in vitro* entre KLC1 et tubuline n'est possible qu'en présence de CRMP2. De plus l'inhibition de l'expression de CRMP2 ou de KLC1 va provoquer une diminution de la vitesse du transport axonal de la tubuline fusionnée à la GFP (Kimura et al., 2005). Cette étude complète la théorie selon laquelle la stimulation de l'assemblage des microtubules passe par l'interaction de CRMP2 avec les dimères de tubuline (Chapitre 8.3.1.1). Il faut toutefois noter que l'interaction préférentielle de CRMP2 avec les dimères de tubuline ainsi que le domaine impliqué restent controversés (Chae et al., 2009; Lin et al., 2011).



En effet, certains laboratoires n'ont pas retrouvé de capacité de liaison à la tubuline dans la portion C-terminale des CRMP comportant les aa 323 à 381 originellement identifiés (Fukata et al., 2002). De plus, les auteurs montrent que la liaison de CRMP2 aux microtubules est sensible au taxol et à l'épothilone-B. Ceci suggère donc que cette interaction ne soit pas spécifique des dimères libres de tubuline.

L'interaction entre CRMP2 et les protéines Numb (Nishimura et al., 2003; Kawano et al., 2005; Dustrude et al., 2016) mais aussi Eps15, l'ubiquitine ligase Nedd4-2 (Dustrude et al., 2016) ou l' $\alpha$ -adaptine (Nishimura et al., 2003) semblent médier l'endocytose clathrine-dépendante de protéines transmembranaires comme la molécule d'adhérence neuronale L1 (Nishimura et al., 2003) et le canal sodique NaV1.7 (Dustrude et al., 2016) (Chapitre 8.3.5). La surexpression de Numb suffit à compenser la diminution de la croissance axonale induite par l'inhibition de l'expression de CRMP2. Cet effet est d'ailleurs corrélé à la proportion de molécules d'adhérence L1 endocytées au niveau des cônes de croissance (Nishimura et al., 2003).

Globalement, ces fonctions adaptatrices de CRMP2 semblent reliées à la détermination de l'axone ainsi qu'à la croissance axonale du fait de la spécificité de la Kinésine-1 pour ce compartiment cellulaire (Figure 19).

Enfin CRMP4 pourrait aussi jouer un rôle dans le trafic vésiculaire. En effet, elle se co-localise, au niveau des cônes de croissance, avec les vésicules enrichies en protéine SV2 (Synaptic Vesicle protein 2) et interagit avec la protéine adaptatrice Intersectine-1 via ses domaines SH3A et SH3E (Quinn et al., 2003).

### 8.3.3 Croissance neuritique

#### 8.3.3.1 Via son effet sur le cytosquelette

Les capacités d'interaction des CRMP avec les cytosquelettes d'actine et de tubuline sont clairement impliquées dans les mécanismes de croissance neuritique. En effet, la mutation des domaines de liaison au cytosquelette des CRMP altère leur capacité de modulation de la croissance neuritique. Par exemple, la surexpression de CRMP2 (Brot et al., 2010) ou 4 (Khazaei et al., 2014; Cha et al., 2016) dans des neurones hippocampaux, va stimuler leur croissance neuritique moyenne, en revanche la surexpression de CRMP2 (Fukata et al., 2002) ou 4 (Khazaei et al., 2014; Cha et al., 2016) tronquées de leur domaine d'interaction avec les microtubules inverse son effet (CRMP2) ou l'annule (CRMP4).

La version phospho-mimétique de CRMP2 (S514D) a une interaction diminuée avec la tubuline. La surexpression de ce phospho-mimétique dans des neurones hippocampaux en culture induit une diminution de la croissance neuritique (Yoshimura et al., 2005). De même, la phosphorylation de CRMP2 sur le résidu T555 inhibe son interaction avec la tubuline, et la surexpression de phospho-mimétiques de CRMP2 (T555D) va inhiber la croissance axonale de neurones de DRG (Arimura et al., 2005).

Les mêmes expériences réalisées avec CRMP5 montrent un effet sur la croissance neuritique opposé à celui de CRMP2. Cet effet inhibiteur est par contre perdu lors de la délétion du domaine C-terminal de liaison aux microtubules de CRMP5 (Brot et al., 2010). La surexpression de phospho-déficient de CRMP5 au niveau de son résidu Thréonine<sup>516</sup> (T516A), va fortement diminuer son taux de co-immunoprécipitation avec l' $\alpha$ -tubuline. De plus, ce phospho-déficient de CRMP5 perd sa capacité à diminuer la croissance neuritique hippocampale en culture (Brot et al., 2014) (Tableau 3).

Des capacités régulatrices des CRMP entre elles émergent de nouveau (Chapitre 8.2.5). En effet, la stimulation de la croissance neuritique par CRMP2 est abolie par la surexpression de CRMP5 ou à l'inverse exacerbée par l'inhibition de l'expression de CRMP5 (Brot et al., 2010). Dans une autre étude on peut voir que les effets stimulateurs de la croissance axonale induit par la surexpression des CRMP2 et 4 peuvent être diminués par la surexpression simultanée des CRMP4 et 2 tronquées de leurs domaines de liaison au cytosquelette respectivement (Tan et al., 2015).

|              | Effet sur la croissance neuritique |               |  |
|--------------|------------------------------------|---------------|--|
|              | siRNA                              | Surexpression | Mutants  |
| <b>CRMP2</b> | ↓                                  | ↑             | S514A ↑<br>S514D ↓<br>T555D ↓<br>$\Delta$ Cter (323-572) →<br>$\Delta$ 323-381 ↓ |
| <b>CRMP4</b> | ↓                                  | ↑             | $\Delta$ Cter (470-520) →<br>$\Delta$ Nter (1-323) ↑                             |
| <b>CRMP5</b> | ↑                                  | ↓             | $\Delta$ Cter (472-564) →<br>T516A →<br>T516D ↓                                  |

**Tableau 3 : Récapitulation des effets de la manipulation des interactions entre CRMP et tubuline sur la croissance neuritique de neurones en culture.**

**La modulation des capacités des CRMP à interagir avec le cytosquelette de microtubules va influencer leurs capacités à stimuler ou inhiber la croissance axonale.**

Attention ces expériences n'ont pas toute été réalisées sur le même type neuronal (hippocampe, cortex, DRG).

Adapté des données publiées dans (Fukata et al., 2002; Arimura et al., 2005; Yoshimura et al., 2005; Brot et al., 2010, 2014; Tan et al., 2015; Cha et al., 2016).

### 8.3.3.2 Via la médiation de la transduction des signaux de guidages axonaux

Depuis la découverte par Goshima de l'implication de CRMP2 dans la transduction du signal induit par la sémaphorine 3A (Sema3A) (Goshima et al., 1995), l'effet des différentes CRMP en réponse aux molécules de guidage a été largement exploré.

La signalisation Sema3A peut être reconstituée en système hétérologue en surexprimant ses corécepteurs, la neuropiline-1 (Nrp1) et la PlexineA1 (PlxA1), dans des cellules COS7. Le traitement de ces cellules avec la Sema3A induit leur contraction (Deo et al., 2004). Les CRMP1 à 4 interagissent toutes avec le récepteur pléxine-A1 dans des expériences de co-immuno précipitation. De plus, elles sont toutes capables d'amplifier la réponse à la Sema3A. En effet, leur surexpression concomitante avec les récepteurs NP1 et PlxA1 va permettre d'augmenter la rapidité de la contraction cellulaire en réponse à la Sema3A. De plus, l'incubation des cellules COS7 avec la Sema3A va favoriser l'interaction entre CRMP4 et PlxA1 (Deo et al., 2004). Ce système hétérologue a permis, en outre, d'identifier l'importance de certaines kinases, telles que Fyn et Fes, dans cette voie de signalisation.

La plupart des kinases impliquées dans la phosphorylation des CRMP (GSK3 $\beta$ , Cdk5, ROCK, Fyn, Fes) ont une influence sur la signalisation induite par les sémaphorines et particulièrement la Sema3A qui est de loin la mieux caractérisée (Mitsui et al., 2002; Uchida et al., 2005, 2009; Yukawa et al., 2005). Le traitement de culture de neurones de DRG avec la Sema3A va augmenter la proportion de CRMP2 phosphorylée par Cdk5 et induire le collapse des cônes de croissance. L'utilisation d'ARN interférant avec l'expression de CRMP1 ou 2, tout comme la surexpression de CRMP2 phospho-déficiente pour les résidus ciblés par Cdk5 (S522A), par GSK3 $\beta$  (T509A ou T514A ou S518A) ainsi que par Fyn (Y32F), vont fortement diminuer ce collapse induit par la Sema3A (Brown, 2004; Uchida et al., 2005, 2009). De la même manière, l'expression de l'enzyme Fes, mutée pour sa fonction de kinase, inhibe le collapse en réponse à la Sema3A (Mitsui et al., 2002) et l'utilisation d'inhibiteurs de ROCK altère la réponse à la Sema4A (Yukawa et al., 2005). On remarque qu'au contraire de l'inhibition de l'expression des CRMP, les phospho-mutants des CRMP, ainsi que l'inhibition de kinases qui les phosphorylent, n'abolissent pas totalement les effets morpho-cellulaires des sémaphorines. Ceci peut s'expliquer par le fait que la signalisation sémaphorine semble impliquer différentes voies de signalisations vraisemblablement distinctes. Les CRMP semblent être des effecteurs clés de ces signalisations.

Si les CRMP sont clairement impliquées dans la modulation de la croissance neuritique induite par les sémaphorines, on remarque qu'elles sont aussi un effecteur intracellulaire du collapse des cônes de croissance induit par d'autres molécules de guidage. L'Ephrine-A5 ainsi que l'acide lysophosphatidique (LPA) induisent toutes deux la phosphorylation de CRMP2 par ROCK (S555) et cette phosphorylation est nécessaire au collapse alors qu'elle n'est pas impliquée dans la signalisation Sema3A (Arimura et al., 2000, 2005).

En conclusion, les molécules de guidage vont moduler plus ou moins spécifiquement l'activité des kinases sur les CRMP et par ce biais réguler la croissance neuritique.

#### 8.3.4 Régénération axonale

Les CRMP ont été largement caractérisées dans des contextes neuro-développementaux, cependant ce n'est que plus récemment que la question du possible rôle des CRMP dans la régénération axonale a été posée. Les premières investigations ont porté sur le système nerveux périphérique (SNP). On remarque tout d'abord que la production d'ARNm de CRMP1, 2 et 5 augmente suite à la blessure d'un nerf périphérique (nerf hypoglosse) à l'inverse des ARNm de CRMP3 et 4 qui eux diminuent (Suzuki et al., 2003). Les auteurs montrent alors que l'expression de CRMP2 par infection virale va potentialiser la repousse axonale après une lésion de ce nerf. Dans un autre modèle de lésion nerveuse périphérique (axonotomie du nerf sciatique), une augmentation de la production des ARNm des deux isoformes de CRMP4 est observée (Jang et al., 2010).

Cependant un des challenges de la recherche dans le domaine de la régénération axonale est de comprendre les mécanismes inhibant cette régénération au niveau système nerveux central (SNC). Des travaux pionniers dans ce domaine montrent que cette différence de capacité régénérative entre SNP et SNC seraient, au moins en partie, due à une disparité du micro-environnement de l'axone lésé. En effet, ils montrent que la repousse de neurones centraux est rendue possible s'ils sont greffés dans un environnement périphérique comme le nerf sciatique (Richardson et al., 1980). Depuis lors, la recherche dans le domaine a permis d'identifier diverses molécules inhibitrices présentes dans le SNC après une lésion telles que Nogo, les MAG (Myelin-Associated Glycoprotein), les OMgp (Oligodendrocyte Myelin glycoprotein). A cela s'ajoute la gliose réactionnelle des astrocytes, en association avec l'inhibition induite par les CSPGs (Chondroitin Sulfate Proteoglycans), qui vont créer une barrière physique et chimique à la régénération. Enfin, plus récemment, certaines molécules de guidage ont été ajoutées à la liste des inhibiteurs de la régénération comme l'éphrine-B3, la Sema4D ainsi que le nétrine-1 (pour revue voir Yiu and He, 2006). Il apparaît que toutes ces molécules inhibitrices sont impliquées dans l'activation d'une voie de signalisation commune. En effet, RhoA et ROCK sont des effecteurs intracellulaires dont l'activité est modulée par les MAG, Nogo, OMgp ainsi que les CSPG (pour revue voir Fujita and Yamashita, 2014). De plus, leur modulation a aussi été associée aux molécules de guidages Ephrine-B3 (Sahin et al., 2005), Sema4D (Aurandt et al., 2002; Swiercz et al., 2002) et à la Nétrine-1 (Moore et al., 2008) (Figure 20).

Les CRMP1 et 2 sont des cibles de ROCK (Chapitre 8.2.4.1). La phosphorylation de CRMP2 par ROCK, au niveau du résidu Thréonine<sup>555</sup>, est par exemple induite par un traitement de cultures de neurones du cervelet avec des MAG ou Nogo. Cette phosphorylation va alors inhiber la croissance neuritique de ces neurones (Mimura et al., 2006). CRMP4 n'est pas une cible de phosphorylation de ROCK2 (Alabed et al., 2007). Cependant elle est capable de se lier avec RhoA et ainsi d'inhiber en amont l'activité de ROCK2 (Alabed et al., 2007). A la différence de CRMP4, la forme longue de CRMP1 se lie à ROCK via son domaine kinase. Cette interaction inhiberait la contraction de cellules de neuroblastomes (SY5Y) induite par RhoA en diminuant l'activité de ROCK probablement sur CRMP2 (Leung et al., 2002).

Les variants d'épissage des CRMP semblent jouer des rôles distincts dans cette signalisation RhoA-dépendante. On remarque que la forme longue de CRMP4 (CRMP4-L) présente une plus grande affinité pour RhoA que son isoforme courte. Il semble que cette liaison soit indispensable à l'inhibition de la croissance neuritique induite par l'exposition à la myéline où aux CSPG tel que l'aggrecan. En effet la co-immunoprécipitation de CRMP4-L avec RhoA est stimulée par un traitement préalable avec Nogo. A l'inverse, elle va être inhibée par la co-expression du fragment N-terminal spécifique de la forme longue de CRMP4. En culture de neurones de DRG, la surexpression de ce fragment va bloquer l'inhibition de la croissance axonale induite par la myéline ou l'aggrecan (Alabed et al., 2007). Par la suite, les auteurs ont montré que cette interaction entre CRMP4-L et RhoA est bloquée par la phosphorylation de CRMP4 par GSK3 $\beta$  (Alabed et al., 2010).

Malgré l'apparente importance de la signalisation découlant de RhoA, on remarque tout de même que la phosphorylation de CRMP2 par GSK3 $\beta$  au niveau de son résidu Thréonine<sup>514</sup> semble, elle aussi, suffisante à l'inhibition de la régénération axonale induite par la myéline (Liz et al., 2014).

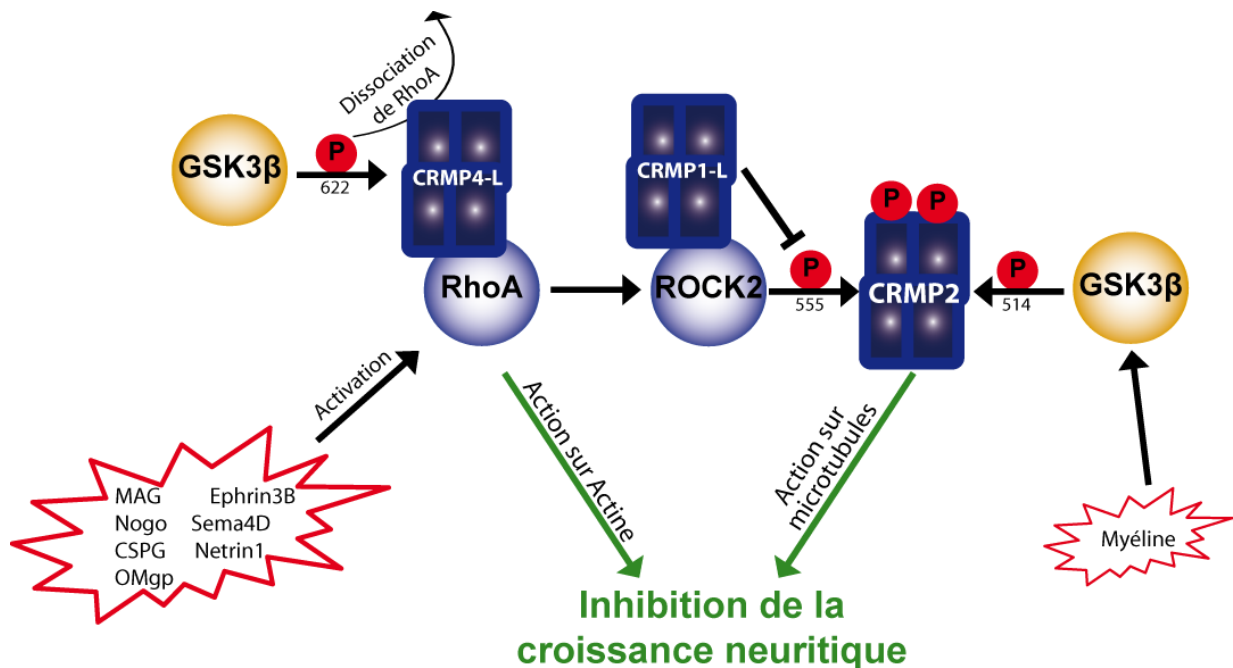


Figure 20 : Schéma récapitulatif de la position centrale de la signalisation RhoA dans l'inhibition de la régénération axonale via son action sur les CRMP.

Adapté des résultats publiés dans (Leung et al., 2002; Alabed et al., 2007, 2010).

### 8.3.5 Régulation des courants ioniques

Certaines études mettent en évidence le rôle des CRMP dans l'adressage à la membrane plasmique de canaux ioniques voltages dépendants (Brittain et al., 2009; Quach et al., 2013; Dustrude et al., 2016).

En effet, la surexpression de CRMP2 ou 3 induit une augmentation des courants calciques de neurones en culture (Brittain et al., 2009; Quach et al., 2011). Cet effet passe par l'interaction entre CRMP2 et les canaux calciques de type N (Cav2.2) (Brittain et al., 2009) alors que l'effet de CRMP3 serait plutôt imputable à son action sur des canaux de type L (Quach et al., 2013). L'utilisation d'ARN interférents dirigés contre CRMP2 va diminuer le nombre de canaux Cav2.2 au niveau de la membrane plasmique des neurones de DRG (Chi et al., 2009), ainsi que des canaux Nav1.07 (Dustrude et al., 2016, 2017), conduisant à une diminution des courants ioniques qui leur sont associés.

Cet adressage membranaire va être modulé par certaines modifications post traductionnelles de CRMP2. Ainsi, sa phosphorylation par Cdk5 va augmenter l'affinité de CRMP2 pour Cav2.2 (Brittain et al., 2009). De la même manière, la SUMOylation de CRMP2 semble diminuer l'activité des canaux calciques (Ju et al., 2013) et augmenter l'adressage des canaux sodiques à la surface de la membrane plasmique (Dustrude et al., 2016). De plus, cette SUMOylation va être favorisée par la phosphorylation préalable par Cdk5 (Dustrude et al., 2016) et la transfection de neurones corticaux avec une CRMP2 non phosphorylable par Cdk5 ou phospho-mimétique (S522A ou S522D) induit une diminution des courants calciques (Brittain et al., 2012). Ceci implique que CRMP2 est capable de moduler l'activité synaptique. En effet, on remarque ainsi que la surexpression de CRMP2 dans des cultures de neurones hippocampaux va augmenter le relargage de glutamate après stimulation, tout en augmentant le diamètre des épines dendritiques (Brittain et al., 2009). Dustrude et al vont plus loin encore dans l'étude de cette fonction de CRMP2 sur les Nav1.07. Ils montrent que, à l'inverse de l'effet de Cdk5, la phosphorylation de CRMP2 par Fyn, va réduire sa SUMOylation, alors que l'affinité de CRMP2 pour des protéines du complexe d'endocytose dépendant de la clathrine va augmenter (Numb, Eps15, Nedd4-2). Ceci permettrait d'augmenter l'endocytose des Nav1.7. Par ce mécanisme, CRMP2 va participer à l'adressage de ces canaux ioniques à la surface de la cellule ou, au contraire, à son internalisation et ainsi moduler la densité des courants qui leur sont associés (Dustrude et al., 2016).

Ces canaux calciques et sodiques sont des cibles thérapeutiques pour le traitement de la douleur (en particulier les douleurs chroniques). Cependant, au vu des nombreux effets secondaires des médicaments ciblant directement ces canaux, les CRMP sont de bons candidats thérapeutiques alternatifs (Wilson et al., 2011; Baumann and Kursula, 2017).

### 8.3.6 Apoptose

Les CRMP sont sensibles au clivage par des protéases non-lysosomiales : les calpaïnes. L'activité de ces enzymes calcium-dépendantes peut être activée par le N-méthyl-D-aspartate (NMDA) dans les neurones (Kowara et al., 2005; Bretin et al., 2006). La troncation par la calpaïne est observée pour toutes les CRMP sauf la 5ème isoforme (Bretin et al., 2006; Liu et al., 2009). Elle conduit à la production d'une seule protéine d'environ 54 à 58 kD, à l'exception de CRMP1 pour laquelle deux produits de clivage sont observés (Bretin et al., 2006). La calpaïne cible un site C-terminal des CRMP, sauf pour CRMP3 pour laquelle le site de clivage est en N-terminal (Hou, 2006; Liu et al., 2009). Ces calpaïnes sont connues pour être localisées dans ce compartiment cellulaire où elles jouent un rôle dans la régulation des fonctions synaptiques (Wu and Lynch, 2006). Il a été proposé que le clivage des CRMP puisse être restreint dans ce compartiment cellulaire et joue un rôle dans cette régulation des fonctions synaptiques (Jiang et al., 2007). La troncation des CRMP a été effectivement impliquée dans des mécanismes de plasticité synaptique et d'apoptose après une ischémie cérébrale (Hou, 2006; Jiang et al., 2007), un stress oxydatif (Kowara et al., 2005) ou encore une excitotoxicité induite par le glutamate (Kowara et al., 2005; Bretin et al., 2006; Hou, 2006).

Les mécanismes sous-jacents au clivage des CRMP sont encore mal connus ; il est possible que la protéine tronquée agisse directement au niveau nucléaire. Rogemond et al. spéculent que le clivage de la portion C-terminale (aa 503 à 570) de CRMP2, contenant une partie des domaines de fixation au cytosquelette, permettrait de détacher la protéine de ses partenaires pour favoriser sa translocation. En effet, il a été montré que le clivage de CRMP2 conduit à l'exposition d'une séquence bipartite de localisation nucléaire (NLS) présente au niveau des acides aminés 470 à 490, engendrant sa localisation nucléaire (Rogemond et al., 2008).



Compte tenu du fait que cette séquence est particulièrement bien conservée entre les CRMP, il est possible que leur translocation passe par le même mécanisme, excepté pour CRMP3 dont le clivage semble plutôt N-terminal. Cependant la localisation nucléaire de la forme clivée de CRMP3 a aussi été reportée (Hou, 2006). Dans une étude plus récente, les auteurs montrent que cette CRMP3 possède une activité déacétylase sur l'histone H4 et ils montrent que cette activité est à l'origine d'une condensation nucléaire conduisant à l'apoptose après une incubation de glutamate sur des neurones corticaux (Hou et al., 2013).

### 8.3.7 Migration cellulaire

Une partie des mécanismes régulant la migration cellulaire met en jeu les mêmes acteurs moléculaires que ceux impliqués dans la croissance neuritique (Ridley et al., 2003). Il n'est donc pas surprenant que les CRMP soient elles aussi identifiées comme des régulateurs de la migration cellulaire.

CRMP1 est nécessaire à la migration des neurones corticaux en réponse à la signalisation induite par la Reelin (Rln) (Yamashita et al., 2006). L'absence de cette molécule sécrétée provoque des défauts de migration cellulaire conduisant à une inversion des couches corticales. Les auteurs montrent que CRMP1 se colocalise avec la protéine adaptatrice dans la signalisation Reelin, disabled-1 (Dab1). Tout comme CRMP1, Dab1 est phosphorylée par la kinase Fyn (Arnaud et al., 2003). CRMP1 et Dab1 sont toutes deux plus fortement exprimées chez les souris KO Reelin (Yamashita et al., 2006). Enfin, le croisement des souris KO CRMP1 avec les souris hétérozygotes pour Dab1 a montré une interaction génétique entre ces protéines. Ce croisement donne lieu à une aggravation de défauts de migrations qui sont similaires à ceux observables chez les souris KO Reelin (Yamashita et al., 2006).

CRMP2 est, elle, mise en jeu dans la régulation de la migration des lymphocytes T induite par la chimiokine CXCL12 (Varrin-Doyer et al., 2009). Dans cette signalisation, CRMP2 va être phosphorylée par la kinase Yes sur le résidu Tyrosine<sup>479</sup>, alors que la phosphorylation par GSK3 $\beta$  va être, à l'inverse inhibée.

Outre CRMP1 et 2, CRMP4 a elle aussi été identifiée dans la régulation de la migration. En effet, la surexpression de CRMP4 inhibe la migration de cellules de neuroblastome (B35), en perturbant probablement la régulation de l'association en faisceaux de l'actine filamenteuse (Rosslenbroich et al., 2005).

Les fonctions des CRMP dans ces phénomènes migratoires font de ces protéines des cibles thérapeutiques potentielles dans le contexte du développement des cancers, et plus particulièrement des processus métastatiques (Shih et al., 2001; Li et al., 2015; Zhou et al., 2015).

#### 8.4 **Les souris KO CRMP**

Des souris invalidées pour chacune des CRMP ont été générées. L'étude de ces animaux a permis à la fois de confirmer *in vivo* de nombreuses fonctions des CRMP, mais aussi d'en identifier de nouvelles. Ces phénotypes sont récapitulés dans le tableau suivant :

|              | <b>Phénotypes neuro-anatomiques et cellulaires observés chez les souris Knock-Out</b>  | <b>Phénotypes comportementaux, ou associés à des pathologies cérébrales, chez les souris Knock-Out ou Knock-in</b>  |
|--------------|--|---|
| <b>CRMP1</b> | <p>Prolifération cellules granulaires cérébelleuses et apoptose (Charrier et al., 2006)</p> <p>Migration neuronale retardée (Yamashita et al., 2006)</p> <p>Mauvaise orientation des dendrites apicales (couche V corticale)</p> <p>Diminution de la densité d'épines dendritiques (couche V corticale) (Yamashita et al., 2007)</p> <p>Altération de la LTP (Su et al., 2007)</p> | <p>Hyperactivité.</p> <p>Diminution de l'inhibition motrice successive à un pré-stimulus, pouvant être rétablie par un traitement à la chlorpromazine.</p> <p>Déficit de mémorisation à long terme. (Yamashita et al., 2013)</p> <p>Déficit de mémorisation spatiale. (Su et al., 2007)</p>   |
| <b>CRMP2</b> | <p>Altération des dendrites primaires (couche V corticale) (Yamashita et al., 2012)</p> <p>Augmentation du branchement des dendrites proximales de neurones hippocampaux en réponse à la Sema3A (Niisato et al., 2012)</p>   | <p>Amélioration du rétablissement moteur et sensitif et de la régénération axonale après lésion de la moelle épinière.</p> <p>Diminution de l'inflammation et de la gliose réactionnelle associée à la lésion.</p> <p>Observations chez la souris CRMP2(S522A) Knock-In (KI) (Nagai et al., 2016a)</p>  |
| <b>CRMP3</b> | <p>Altération de la maturation des épines dendritiques hippocampales associée à une diminution de LTP (Quach et al., 2008b)</p>  | <p>Diminution de l'inhibition motrice successive à un pré-stimulus (Quach et al., 2008a)</p>  |
| <b>CRMP4</b> | <p>Altération des dendrites primaires (couche V corticale)</p> <p>Augmentation du branchement des dendrites proximales de la CA1 et altération de la réponse à la Sema3A (Niisato et al., 2011)</p> <p>Augmentation de la croissance dendritique et hyperactivité au niveau du bulbe olfactif (Tsutiya et al., 2015, 2016)</p>   | <p>Amélioration de la régénération axonale et du rétablissement sensitif et moteur après lésion de la moelle épinière.</p> <p>Limitation de l'inflammation et de la gliose réactionnelle associée à la lésion. (Nagai et al., 2015, 2016b)</p> <p>Altération des vocalisations ultrasoniques associées à l'olfaction des nouveaux nés (Tsutiya et al., 2015)</p> <p>Mort retardée des neurones dopaminergiques chez un modèle d'étude de la maladie de Parkinson. (Tonouchi et al., 2016)</p> |
| <b>CRMP5</b> | <p>Atrophie de cellules de Purkinje et altération de la LTP (Yamashita et al., 2011)</p> <p>Altération de l'interaction entre cellules de Schwann et axone (Camdessanché et al., 2012)</p>   |   |

Tableau 4 : Récapitulation des phénotypes de chacune des souris invalidées pour une des CRMP.

## 8.5 Les CRMP et les maladies psychiatriques

La corrélation entre l'altération des CRMP et la schizophrénie est de plus en plus rapportée dans la littérature.

Tout d'abord, certaines altérations neuro-anatomiques observées chez les souris invalidées pour une ou plusieurs CRMP, font écho à ce qui a pu être observé chez les patients schizophrènes. En particulier, on remarque que l'altération de la cyto-architecture des neurones hippocampaux et de certaines régions corticales, observée chez les souris invalidées pour CRMP1, 2, 3 ou 4, est reportée chez les patients schizophrènes (Harrison, 2004; Garey, 2010). A cela s'ajoute l'action de ces CRMP, fortement modulée par la kinase Cdk5, dont l'activateur neuronal (p35) est sous-exprimé dans le cortex préfrontal et l'hippocampe de cerveaux post-mortem de patients schizophrènes (Engmann et al., 2011). CRMP1 est aussi nécessaire à la transduction du signal induit par la Reelin (Yamashita et al., 2006), et on remarque que les niveaux de Reelin sont aussi diminués dans les cerveaux post-mortem de patients schizophrènes (Guidotti et al., 2000).

Ensuite, ces phénotypes cellulaires sont associés à des altérations comportementales caractéristiques de la schizophrénie. L'altération de l'inhibition motrice successive à un pré-stimulus observée chez les souris KO CRMP1 ou CRMP3 en est un bon exemple (Braff and Geyer, 1990). On remarque d'ailleurs que ce phénotype peut être amélioré par le traitement avec un antipsychotique (la chlorpromazine) des souris KO CRMP1. Allant dans ce sens, une étude a montré des variations des niveaux de phosphorylation des CRMP 2 et 4 après le traitement de rats avec d'autres antipsychotiques (la clozapine, et le rispéridone) (Kedracka-Krok et al., 2014).

Enfin, un polymorphisme des gènes codant CRMP1 et CRMP2 ainsi qu'une altération du niveau d'expression hippocampal de CRMP2 ont été montrés chez des cohortes de patients schizophrènes (Edgar et al., 2000; Beasley et al., 2006; Bader et al., 2012). De plus les gènes *crmp2* (8p22-p21) mais aussi *crmp3* (10q26) et *crmp4* (5q32), sont localisés dans des régions chromosomales associées à un facteur de risque pour la schizophrénie (Ross et al., 2000). Pour finir, une diminution de l'expression de CRMP4 au niveau des régions CA2 et CA3 de l'hippocampe a aussi été reportée chez des patients schizophrènes (Föcking et al., 2011). Cette diminution semble sous le contrôle du gène *MIR137* (codant pour le micro-RNA 137), qui est aussi un gène de susceptibilité à la schizophrénie.

D'autres pathologies psychiatriques ont été associées aux CRMP. On retrouve notamment, Alzheimer où une hyperphosphorylation de CRMP2 est observée, la dépression où ce sont principalement les altérations hippocampales dues aux CRMP qui semblent en cause, les douleurs neuropathiques mettant en jeu la régulation des canaux ioniques CaV et NaV par les CRMP2 et 3 (chapitre 8.3.5). Enfin des variations des niveaux d'expression des CRMP sont rapportées dans des études sur l'épilepsie et les maladies à prion humain. Pour revue voir (Quach et al., 2015).

## 9 Objectif de ma thèse :

L'équipe d'Annie Andrieux, qui m'a accueilli durant ma thèse, s'intéresse à la physiopathologie du cytosquelette. Dans ce cadre, un des champs d'investigation principaux de cette équipe porte sur l'étude des fonctions des protéines MAP6, allant des aspects biochimiques et cellulaires jusqu'aux fonctions intégrées de la protéine chez l'animal. Mon travail a principalement porté sur l'étude des fonctions de MAP6 dans le développement neuronal.

La souris KO MAP6, a été reconnue au cours des dernières années comme modèle pour l'étude de pathologies psychiatriques. Parmi les causes de survenue de ces pathologies, une théorie neuro-développementale propose que certaines prédispositions puissent être acquise par l'altération du développement cérébral au cours de l'embryogénèse. Concordant avec cette théorie l'analyse structurale des cerveaux des souris KO MAP6 a pu mettre en évidence une corrélation entre les troubles comportementaux de ces souris et des altérations bien spécifiques de leurs cerveaux, comme l'absence de fornix post-commissural. Ce défaut ne semble pas dû à l'absence des capacités de MAP6 à stabiliser les microtubules, mais plutôt à la perte de ses fonctions signalisatrices dans le guidage axonal induit par la sémaphorine 3E. C'est pourquoi nous avons analysé les partenaires protéiques interagissant avec l'isoforme neuronale de MAP6 (N-MAP6), afin d'identifier de nouvelles protéines pouvant compléter cette cascade de signalisation. Cette étude en spectrométrie de masse a permis d'identifier trois membres de la famille des CRMP (les CRMP1, 2 et 4).

L'objectif principal de ma thèse a été d'évaluer la potentielle importance de ces CRMP dans la signalisation induite par la sémaphorine 3E. Auquel cas nous évaluerions la fonction de ces CRMP dans la formation du fornix. Dans un second temps j'ai eu pour objectif d'approfondir les connaissances des altérations neuro-anatomiques des souris KO MAP6. Pour cela un projet en collaboration avec une équipe de l'institut spécialisé dans l'imagerie IRM a été mise en place. L'objectif de cette collaboration est de tenter de détecter ces altérations en DTI (Diffusion Tensor Imaging), puis de confirmer ces observations en histologie.

# Résultats

## 10 Résultats

### 10.1 **Résumé de l'article " Microtubule-associated protein 6 mediates neuronal connectivity through Semaphorin 3E-dependent signaling for axonal growth. "**

par JC Deloulme, S Gory-Fauré, F Mauconduit, S Chauvet, J Jonckheere, **B Boulan**, E Mire, J Xue, M Jany, C Maucler, AA Deparis, O Montigon, A Daoust, E.L Barbier, C Bosc, N Deglon, J Brocard, E Denarier, I Le Brun, K Pernet-Gallay, I Vilgrain, P.J. Robinson, H Lahrech, F Mann & A Andrieux.

**Nature Communication 2015** Jun 3; 6:7246; DOI: 10.1038/ncomms8246

L'inactivation, chez la souris, du gène codant pour la protéine MAP6 (KO MAP6) induit des défauts biologiques et neurochimiques associés avec des altérations profondes du comportement. Il a été démontré que ces souris ont un phénotype reproduisant de nombreux symptômes couramment observés chez les patients atteints de schizophrénie. Certains de ces troubles comportementaux sont corrigés par les neuroleptiques ou les antidépresseurs utilisés classiquement pour le traitement de ces pathologies (Andrieux et al., 2002; Bégou et al., 2008; Delotterie et al., 2010).

L'étude par IRM du cerveau des souris KO MAP6 confirme la diminution du volume cérébral global, associé à un élargissement des ventricules. Ces défauts proviennent plus particulièrement d'une altération de connectivités neuronales et donc affectent préférentiellement la substance blanche (Figure1). Certains faisceaux d'axones sont ainsi altérés (comme la commissure antérieure ou le fornix), alors que d'autres non (comme le faisceau mammillo-thalamique), montrant une spécificité des conséquences de l'absence de MAP6 sur l'intégrité de certains faisceaux neuronaux (Tableau 1). Parmi les faisceaux touchés, le fornix est drastiquement affecté. En effet, l'absence totale de sa portion post-commissurale est observable dès le stade développemental E18.5 de ces souris (Figure 4) et perdure à l'âge adulte (Figure 3). Plusieurs études ont mis en évidence une altération du fornix chez des patients atteints de schizophrénie (Lee et al., 2013; Goghari et al., 2014). Il nous a donc paru intéressant de mieux comprendre le rôle que pouvait jouer MAP6 dans la mise en place de ce faisceau.



La sémaphorine 3E (Sema3E) joue un rôle essentiel dans la formation du fornix (Chauvet et al., 2007; Bellon et al., 2010). Nous avons pu montrer que MAP6 est indispensable à la signalisation de la Sema3E au cours du développement du fornix. En effet, en l'absence de MAP6, les neurones du subiculum, à l'origine du fornix, ne répondent plus à cette molécule de guidage (Figure 5). La régulation de cette signalisation par MAP6 a vraisemblablement lieu en intracellulaire après l'activation du complexe récepteur de la Sema3E (Neuropiline-1/Pléxine-D1/VEGFR2). En effet, la transduction du signal de la Sema3E conduit à la phosphorylation du VEGFR2, phénomène n'étant pas affecté par l'absence de MAP6 (Figure 6).

De manière surprenante, les sites de liaison aux microtubules de MAP6 ne sont pas impliqués dans ce mécanisme, révélant pour la première fois un rôle de cette protéine indépendant de son interaction directe avec les microtubules (Figure 7). La fonction de MAP6 dans cette signalisation semble en revanche mettre en jeu son interaction avec des protéines à module SH3 à travers son domaine PDR (proline rich domain) (Figure 7).

Ma contribution à cette étude a porté sur l'analyse des interactions entre MAP6 et le complexe tripartite récepteur de la Sema3E exprimé par les neurones du subiculum (Bellon et al., 2010). A travers des expériences de co-immunoprécipitation en système hétérologue, j'ai tout d'abord montré que MAP6 est capable d'interagir indépendamment avec chacun de ces récepteurs (Figure Sup 7). De plus, j'ai observé que la précipitation de la Neuropiline-1, ou de la Pléxine-D1, est suffisante à co-immunoprécipiter les autres membres du complexe tripartite avec MAP6 (Figure 7 et Figure Sup 7).

A travers cette étude, il émerge un modèle dans lequel MAP6 jouerait un rôle de chaperonne, permettant de rassembler différents protagonistes de la signalisation découlant de la Sema3E, afin de permettre leur fonction au niveau du cône de croissance.

## 10.2 **Article 1 : " Microtubule-associated protein 6 mediates neuronal connectivity through Semaphorin 3E-dependent signaling for axonal growth. "**

ARTICLE

Received 2 Oct 2014 | Accepted 22 Apr 2015 | Published 3 Jun 2015

DOI: 10.1038/ncomms8246

OPEN

# Microtubule-associated protein 6 mediates neuronal connectivity through Semaphorin 3E-dependent signalling for axonal growth

Jean-Christophe Deloulme<sup>1,2</sup>, Sylvie Gory-Fauré<sup>1,2</sup>, Franck Mauconduit<sup>1,2</sup>, Sophie Chauvet<sup>3</sup>, Julie Jonckheere<sup>1,2</sup>, Benoit Boulan<sup>1,2</sup>, Erik Mire<sup>3</sup>, Jing Xue<sup>4</sup>, Marion Jany<sup>1,2</sup>, Caroline Maucler<sup>1,2</sup>, Agathe A. Deparis<sup>1,2</sup>, Olivier Montigon<sup>1,2,5,6</sup>, Alexia Daoust<sup>1,2</sup>, Emmanuel L. Barbier<sup>1,2</sup>, Christophe Bosc<sup>1,2</sup>, Nicole Deglon<sup>7,8</sup>, Jacques Brocard<sup>1,2</sup>, Eric Denarier<sup>1,2,10</sup>, Isabelle Le Brun<sup>1,2</sup>, Karin Pernet-Gallay<sup>1,2</sup>, Isabelle Vilgrain<sup>2,9,10</sup>, Phillip J. Robinson<sup>4</sup>, Hana Lahrech<sup>1,2,11,\*</sup>, Fanny Mann<sup>3,\*</sup> & Annie Andrieux<sup>1,2,10</sup>

Structural microtubule associated proteins (MAPs) stabilize microtubules, a property that was thought to be essential for development, maintenance and function of neuronal circuits. However, deletion of the structural MAPs in mice does not lead to major neurodevelopment defects. Here we demonstrate a role for MAP6 in brain wiring that is independent of microtubule binding. We find that MAP6 deletion disrupts brain connectivity and is associated with a lack of post-commissural fornix fibres. MAP6 contributes to fornix development by regulating axonal elongation induced by Semaphorin 3E. We show that MAP6 acts downstream of receptor activation through a mechanism that requires a proline-rich domain distinct from its microtubule-stabilizing domains. We also show that MAP6 directly binds to SH3 domain proteins known to be involved in neurite extension and semaphorin function. We conclude that MAP6 is critical to interface guidance molecules with intracellular signalling effectors during the development of cerebral axon tracts.

<sup>1</sup>INSERM, U836, F-38000 Grenoble, France. <sup>2</sup>Univ. Grenoble Alpes, Grenoble Institut Neurosciences, F-38000 Grenoble, France. <sup>3</sup>Aix-Marseille Université, CNRS, IBDM UMR 7288, 13288 Marseille, France. <sup>4</sup>Cell Signalling Unit, Children's Medical Research Institute, University of Sydney, Wentworthville, New South Wales 2145, Australia. <sup>5</sup>Centre Hospitalier Universitaire de Grenoble, IRMaGe, 38043 Grenoble, France. <sup>6</sup>CNRS, UMS 3552, 38042 Grenoble, France. <sup>7</sup>Lausanne University Hospital (CHUV), Department of Clinical Neurosciences (DNC), Laboratory of Cellular and Molecular Neurotherapies (LCMN), 1011 Lausanne, Switzerland. <sup>8</sup>Lausanne University Hospital (CHUV), Neuroscience Research Center (CRN), 1011 Lausanne, Switzerland. <sup>9</sup>INSERM, U1036, 38054 Grenoble, France. <sup>10</sup>CEA, iRTSV, F-38000 Grenoble, France. <sup>11</sup>CEA, LETI, CLINATEC, MINATEC Campus, F-38054 Grenoble, France. \* These authors contributed equally to this work. Correspondence and requests for materials should be addressed to A.A. (email: annie.andrieux@ujf-grenoble.fr) or to J.-C.D. (email:deloulme@ujf-grenoble.fr).

Appropriate adult brain function depends on the complex architecture of neuronal networks and synaptic connections that are elaborated during neurodevelopment. Convergent data show that abnormal anatomical and functional connectivity occurs in the brain of patients suffering from psychiatric diseases such as schizophrenia or bipolar disorder<sup>1–6</sup>. For proper brain connectivity, neuronal morphogenesis and differentiation requires a coordinated and dynamic organization of cytoskeletal elements, including the microtubular network. Microtubules (MTs) play key roles in these processes and determine axon formation<sup>7</sup> and regulate the dynamics of dendritic spines<sup>8</sup>. Impairment of certain MT effectors causes severe neurodevelopmental disorders including lissencephaly, double cortex syndrome or microcephaly<sup>9–11</sup>. Among the MT regulators is a family of structural MAPs, including MAP1, MAP2, Tau and MAP6, which were first described as MT-stabilizing proteins<sup>12–15</sup>. Acute inhibition of any structural MAP in neuronal cell lines have led to impaired neuritic outgrowth providing the idea that MT stabilization would be crucial for normal neuronal differentiation during brain formation<sup>16–19</sup>. However and very strikingly, none of the knockout of structural MAP genes has led to lethal phenotypes due to massive neuronal differentiation impairments<sup>20–23</sup>. These findings raise the possibility of alternative roles of the structural MAPs during neurodevelopment, which still need to be identified.

Within the structural MAPs, MAP6 (also known as STOP for Stable-Tubule-Only-Polypeptide) was first characterized as a MT cold-stabilizing factor whose activity was inhibited by interaction with Ca<sup>2+</sup>-calmodulin<sup>24</sup>. The two main isoforms of MAP6 MAP6-E, which is expressed during neurodevelopment and in the adult brain, and MAP6-N, which is expressed postnatally<sup>16,25</sup>, exhibit pronounced axonal localization<sup>26,27</sup>. MAP6 null mice (MAP6 KO) are viable but display severe behavioural disorders associated with synaptic plasticity impairments and exhibit alterations in multiple neurotransmission<sup>23,28–30</sup>. Their behavioural and biological alterations resemble schizophrenia-related symptoms, and indeed, long-term treatment with antipsychotic drugs alleviates several of the behavioural and biological defects<sup>23,31,32</sup>. Their behavioural impairments may also rely on axonal disconnectivity, as some evidence points to structural changes in brain anatomy and connectivity of MAP6-KO mice<sup>26,28,33,34</sup>. However, a global and detailed analysis of brain alterations is as yet missing.

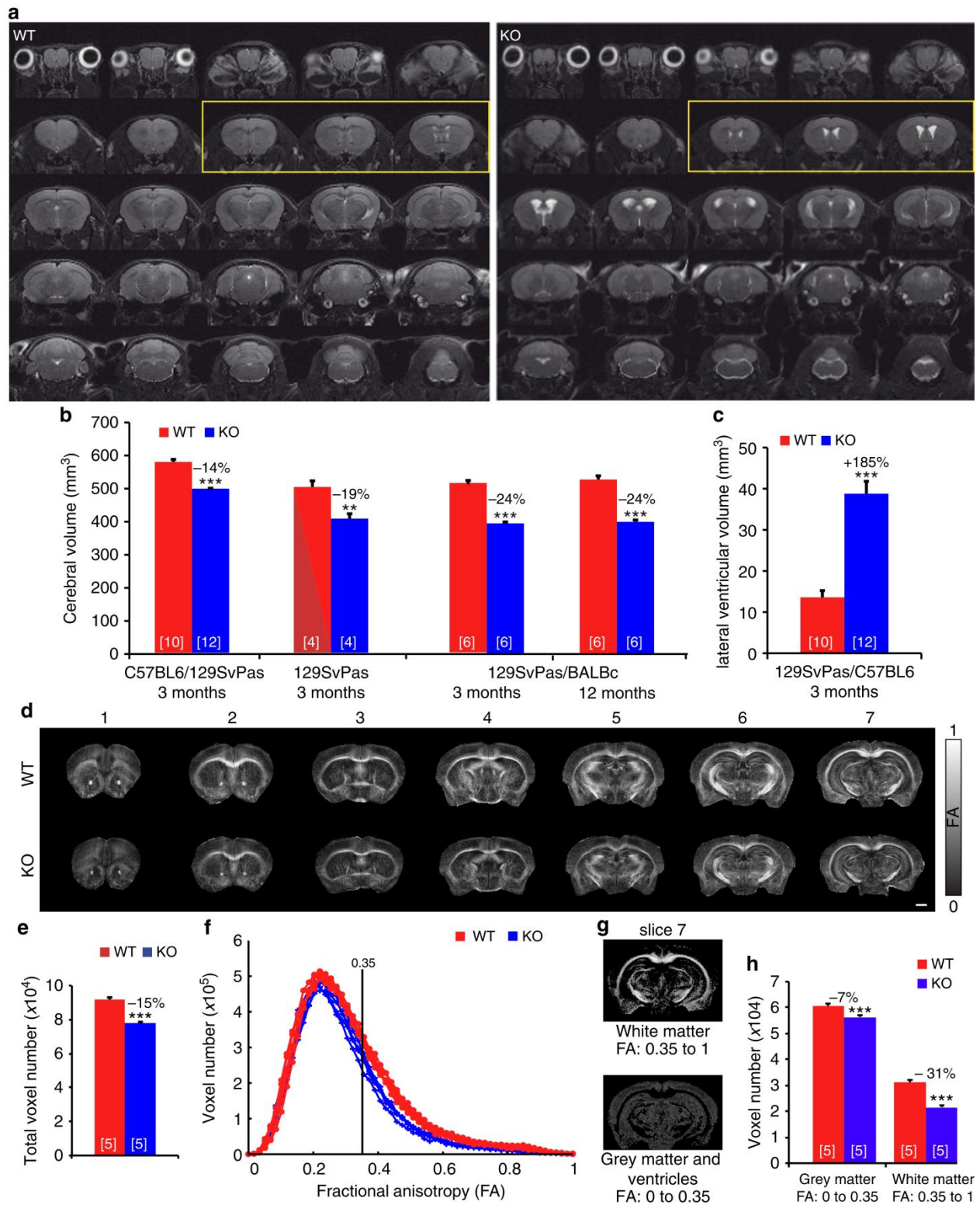
Here we examined the organization and structural integrity of the white matter in MAP6-KO mice. We found that MAP6 deletion causes severe hypoplasia of cerebral commissures and long-distance projecting axon tracts. The most striking defect is the absence of the post-commissural part of the fornix, producing neuronal disconnectivity between the hippocampus and the hypothalamus. Fornix formation is known to be dependent on signalling by the axon guidance cue *Sema3E*<sup>35,36</sup>. We demonstrated here that MAP6 plays a pivotal role downstream of *Sema3E* in promoting axonal growth and attractive guidance. MAP6-E binds to components of the *Sema3E* receptor complex and mediates interactions with downstream effectors through a proline-rich domain that is distinct from domains required of MT stabilization. Therefore, MAP6 is crucial for the establishment of functional *Sema3E*-dependent neural circuits via a MAP6 signalling function integrating semaphorin signalling, independent of microtubule binding. This reveals a previously unrecognized signalling function for MAP6, acting as a positional scaffold protein interfacing microtubule network and signalling events triggered by guidance cue receptors for the neuronal wiring.

## Results

**MAP6 deletion induces reduced brain volume.** To examine how MAP6 controls brain organization, we first used *in vivo* magnetic resonance imaging (MRI) to monitor the brain size of MAP6-KO mice from three genetic backgrounds (Fig. 1). Representative coronal T2-weighted images from wild-type (WT) and MAP6-KO mice were used to quantify the whole brain volume (Fig. 1a). Adult MAP6-KO mice from each genetic background showed reduced brain volume: 14% in homogeneous inbred C57BL6/129 SvPas-F1 mice, 19% in pure 129 SvPas mice and 24% reduction in heterogeneous non-inbred BALBc/129 SvPas-F2 mice, compared with WT littermates (Fig. 1b). A longitudinal study performed on BALBc/129 SvPas-F2 mice showed that the brain volume remained unchanged between 3 and 12 months of age, suggesting that the reduced brain volume was not progressive with age (Fig. 1b). Associated with the volume reduction was a global ventricle enlargement (Fig. 1a,c). All subsequent data were obtained using WT and KO mice on a homogeneous inbred 50% C57BL6/50% 129SvPas-F1 genetic background. We then used diffusion tensor imaging (DTI) to discriminate between grey matter (GM), mostly composed of neuronal cell bodies, and white matter (WM), mostly composed of myelinated axonal tracts. We focused on the forebrain that encompasses the major limbic cerebral structures implicated in the control of behaviours. Typical maps of fractional anisotropy (FA) values are shown in Fig. 1d, bright structures correspond to high FA values, that is, fibre bundles of WM and dark structures correspond to low FA values, that is, GM and ventricles. In all forebrain images of KO and WT mice, the brain was delineated and the total number of voxels (pixels x thickness of the slice) was calculated for both genotypes. We observed a 15% reduction of voxel number in the forebrain of MAP6-KO mice as compared with WT mice (Fig. 1e), which is in agreement with the 14% total brain volume reduction obtained using anatomical T2-weighted MRI (Fig. 1b). The reduced voxel number in MAP6-KO mice was not homogeneously distributed among FA values, being more pronounced for FA values ranging from 0.3 to 0.6 (Fig. 1f). WM can be discriminated from GM by selecting FA values above 0.35 (Fig. 1g) and in MAP6-KO brains the number of voxels are reduced by 31% ( $P = 8.6 \cdot 10^{-3}$ ) for FA values above 0.35 (WM) and by 7% ( $P = 2.5 \cdot 10^{-5}$ ) for FA values below 0.35 (GM) (Fig. 1h). Therefore, MAP6-KO mice exhibit reduction in whole brain volume that is associated with strong deficits in axonal fibre tracts.

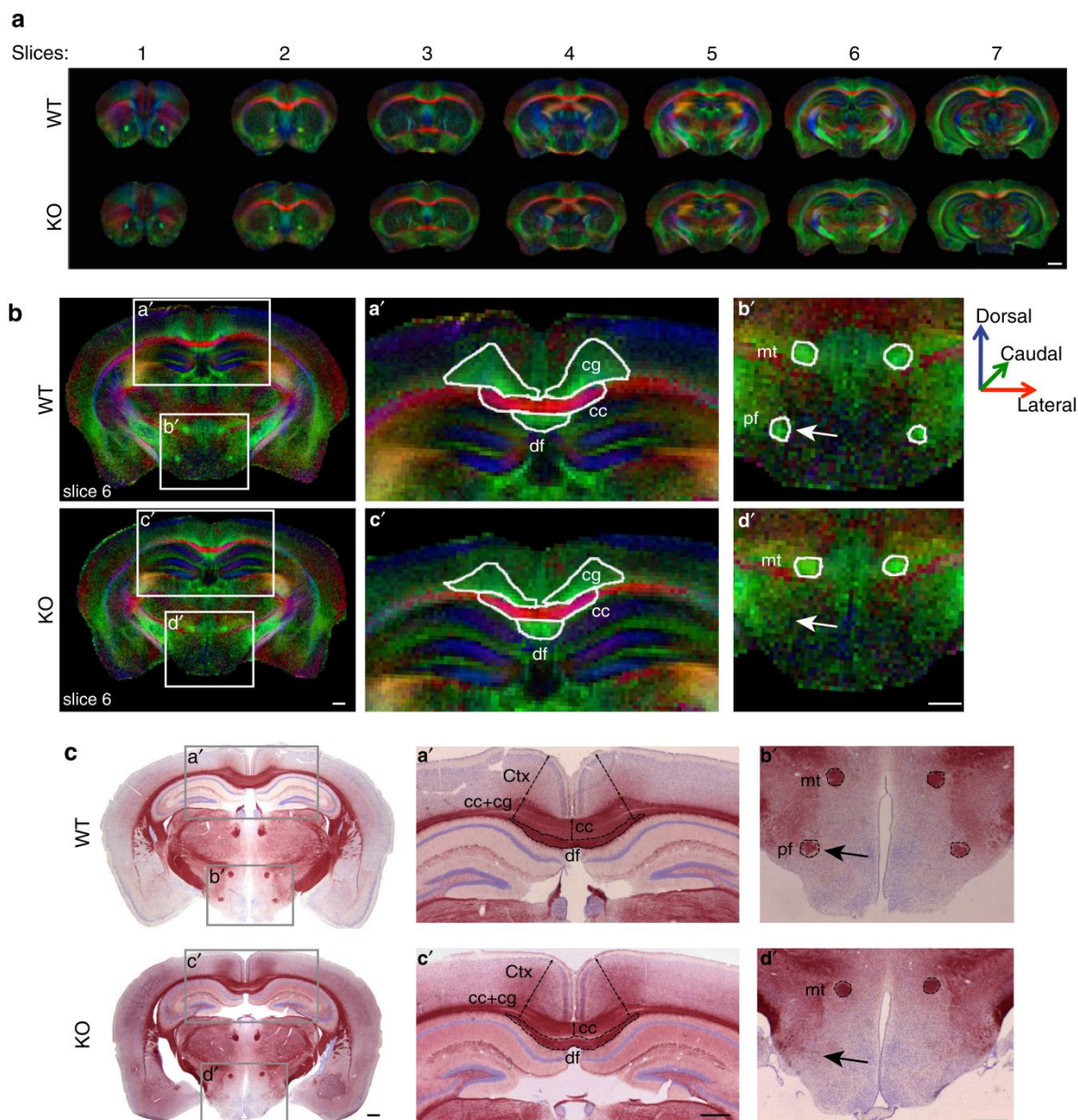
**MAP6 is required for axonal tracts integrity.** We next use the DTI colour map, which graphically illustrates the direction of fibres, to perform a detailed and global examination of axonal tracts within the forebrain (Fig. 2a,b, Table 1). Analysis of FA colour maps from MAP6-KO as compared with WT brains revealed a severe diminution of the size of the corpus callosum (Fig. 2b, Table 1, 25 to 35%), the cingulum (Fig. 2b, Table 1, up to 26%), the internal capsule (not shown, Table 1, 44%), the anterior commissure (not shown, Table 1, 26 to 27%), and the cerebral peduncle (not shown, Table 1, 24 to 34%). Other tract sizes were less affected, such as the fimbria (not shown, Table 1, up to 11%) or unaffected, such as the mammillary tract or the dorsal fornix (Fig. 2b, Table 1). Thus, MAP6 deletion induced a non-uniform alteration of axonal tracts. To avoid a possible under-estimation of tract sizes due to reduction of FA values we performed a classical histological study on coronal forebrain brain sections to accurately measure fibre track size (Fig. 2c and data not shown). Slices were selected based on morphometric landmarks and stained for myelin with gold chloride and Nissl substance with





**Figure 1 | Reduced brain volume in MAP6-KO mice associated with deficits in axonal fibre tracts.** (a) Representative galleries of T2-weighted MRI coronal sections used to determine the whole-brain and lateral ventricle volumes from WT and MAP6-KO mice. All sections were used to determine the cerebral volumes shown in **b**. Sections in the yellow frame were used to determine the lateral ventricle volume shown in **c**. (b) Cerebral volume in WT and MAP6-KO mice. A systematic decrease of MAP6-KO mice cerebral volume in different genetic backgrounds. (c) Histogram from MRI data showing ventricle enlargement in MAP6-KO mice. (d) Representative fractional anisotropy (FA) maps of the brains of WT and MAP6-KO. Scale bar, 1 mm. (e) Histogram showing a reduction of total voxel number of MAP6-KO brain. (f) Histograms showing the voxel number distribution according to FA values (the histogram of each mouse is individually plotted). FA threshold of 0.35 is used for white matter segmentation. (g) Typical FA maps segmentation from WT mouse. Image with FA > 0.35 corresponds to the white matter imaging and FA < 0.35 to grey matter and ventricles. (h) Histograms of voxel numbers corresponding to FA < 0.35 and FA > 0.35. In all panels, number of analysed mice is between brackets. Values are given as mean ± s.e.m. Percentages of change between KO and WT are indicated. \*\**P* < 0.01; \*\*\**P* < 0.001 (Student's *t*-test).





**Figure 2 | Axonal tracts are defective in MAP6-KO mice.** (a) Representative galleries of FA colour maps in which the colour code indicates the spatial direction of the free diffusion along the axons with medial-lateral (red), ventral-dorsal (blue) and rostral-caudal (green) orientations. Scale bar, 1 mm. (b) Representative FA colour-maps (slices 6 from a) used to draw each axonal tract. FA values and region of interest (ROI) surface areas for each tract are reported in Table 1. Scale bar, 500  $\mu\text{m}$ . (c) Representative coronal brain sections of WT and MAP6-KO forebrain stained with gold chloride and counterstained with cresyl violet used to measure the area and the thickness of axonal tracts and brain regions. Scale bar, 500  $\mu\text{m}$ . Note in panels b' and d' that the post-commissural part of fornix (arrow, pf) is undetectable in the MAP6-KO brain slice after gold staining or DTI images. cc = corpus callosum; cg = cingulum; Ctx = cortex; df = dorsal fornix; mt = mammillary tract and pf = post-commissural fornix.

cresyl violet (Fig. 2c). This analysis revealed that axonal tracts are differentially affected, with a severe reduction of the area for the corpus callosum (Fig. 2c, up to 32%,  $P = 7 \times 10^{-5}$ ), the anterior commissure (not shown, up to 61%,  $P = 1.1 \times 10^{-05}$ ) and of the internal capsule (not shown, up to 49%,  $P = 3.5 \times 10^{-05}$ ), whereas other tracks are less severely affected such as the fasciculus retroflexus (not shown, 29%,  $P = 1.4 \times 10^{-3}$ ) or the fimbria (not shown, up to 23%,  $P = 4.0 \times 10^{-3}$ ).

One striking observation of both FA colour maps and histological slices was the absence of the ventral part of the fornix, defined as the post-commissural fornix (pf) in MAP6-KO brains (Fig. 2b,c, arrows).

To assess fibre integrity, we compared the FA values between WT and MAP6-KO for each axonal tract (Table 1). FA values, for several axon tracts with reduced dimension, including the anterior commissure, the corpus callosum and the cingulum, are significantly affected in KO mice, with an average reduction of 15, 13 and 18%, respectively (Table 1). By contrast, FA values for the cerebral peduncle were not affected, despite size reduction. In addition, FA values of the dorsal fornix, the mammillary tract, the supraoptic and optic tracts were not affected. To properly interpret the FA changes, which are sensitive to myelin integrity, density and to the intra- and extracellular compartment volumes, we used transmission electron microscopy to investigate the

**Table 1 | FA values and ROI surface are expressed as mean ± s.e.m.**

| Slices  | 2           |               | 3            |             | 4           |             | 5           |               | 6            |               | 7             |             | KO          |
|---|-------------|---------------|--------------|-------------|-------------|-------------|-------------|---------------|--------------|---------------|---------------|-------------|-------------|
|   | 1           | KO            | WT           | KO          | WT          | KO          | WT          | KO            | WT           | KO            | WT            | KO          |             |
| <i>Corpus callosum (cc)</i>                         |             |               |              |             |             |             |             |               |              |               |               |             |             |
| FA  |             | 0.60 ± 0.03   | 0.53 ± 0.02  | 0.61 ± 0.02 | 0.53 ± 0.02 | 0.64 ± 0.01 | 0.50 ± 0.01 | 0.64 ± 0.02   | 0.52 ± 0.01  | 0.73 ± 0.02   | 0.72 ± 0.02   | 0.76 ± 0.02 | 0.67 ± 0.01 |
| SURFACE (mm <sup>2</sup> )                          |             | 1.46 ± 0.06   | 1.08 ± 0.07  | 0.92 ± 0.05 | 0.70 ± 0.02 | 0.75 ± 0.04 | 0.56 ± 0.03 | 0.54 ± 0.05   | 0.35 ± 0.03  | 0.44 ± 0.21   | 0.32 ± 0.04   | 0.91 ± 0.06 | 0.82 ± 0.07 |
|   |             |               | *(−12)       |             | *(−13)      |             | *** (−22)   |               | ** (−18)     |               | *(−27)        |             | ** (−12)    |
|   |             |               | ** (−26)     |             | ** (−24)    |             | ** (−25)    |               | ** (−35)     |               |               |             |             |
| <i>Cingulum (cg)</i>                                |             |               |              |             |             |             |             |               |              |               |               |             |             |
| FA  |             |               |              | 0.41 ± 0.01 | 0.33 ± 0.01 | 0.42 ± 0.01 | 0.34 ± 0.01 | 0.44 ± 0.01   | 0.37 ± 0.01  | 0.54 ± 0.01   | 0.49 ± 0.02   | 0.58 ± 0.02 | 0.44 ± 0.02 |
| SURFACE (mm <sup>2</sup> )                          |             |               |              | 0.39 ± 0.03 | 0.38 ± 0.03 | 0.43 ± 0.02 | 0.32 ± 0.01 | 0.37 ± 0.04   | 0.27 ± 0.04  | 0.29 ± 0.03   | 0.22 ± 0.03   | 0.17 ± 0.03 | 0.13 ± 0.01 |
|   |             |               |              |             | *** (−20)   |             | ** (−19)    |               | ** (−16)     |               | *(−9)         |             | *** (−24)   |
|   |             |               |              |             |             |             | ** (−26)    |               |              |               | *(−24)        |             |             |
| <i>Anterior commissure (ac)</i>                     |             |               |              |             |             |             |             |               |              |               |               |             |             |
| FA  | 0.71 ± 0.03 | 0.59 ± 0.02   | 0.68 ± 0.003 | 0.64 ± 0.01 | 0.47 ± 0.01 | 0.37 ± 0.02 |             |               |              |               |               |             |             |
| SURFACE (mm <sup>2</sup> )                          | 0.07 ± 0.01 | 0.069 ± 0.003 | 0.11 ± 0.01  | 0.08 ± 0.01 | 0.42 ± 0.03 | 0.31 ± 0.04 |             |               |              |               |               |             |             |
|   |             | *(−17)        |              | *(−6)       |             | *** (−21)   |             |               |              |               |               |             |             |
|   |             |               |              | *(−27)      |             | *(−26)      |             |               |              |               |               |             |             |
| <i>Fimbria (fi)</i>                                 |             |               |              |             |             |             |             |               |              |               |               |             |             |
| FA  |             |               |              |             |             | 0.46 ± 0.02 | 0.37 ± 0.02 | 0.52 ± 0.01   | 0.48 ± 0.02  |               |               |             |             |
| SURFACE (mm <sup>2</sup> )                          |             |               |              |             |             | 1.91 ± 0.19 | 2.15 ± 0.18 | 1.18 ± 0.05   | 1.05 ± 0.03  |               |               |             |             |
|   |             |               |              |             |             |             |             |               | *(−11)       |               |               |             |             |
| <i>Internal capsule (ic)</i>                        |             |               |              |             |             |             |             |               |              |               |               |             |             |
| FA  |             |               |              |             |             |             |             | 0.41 ± 0.01   | 0.37 ± 0.008 |               |               |             |             |
| SURFACE (mm <sup>2</sup> )                          |             |               |              |             |             |             |             | 1.65 ± 0.14   | 0.92 ± 0.07  |               |               |             |             |
|   |             |               |              |             |             |             |             |               | ** (−44)     |               |               |             |             |
| <i>Dorsal fornix (df)</i>                           |             |               |              |             |             |             |             |               |              |               |               |             |             |
| FA  |             |               |              |             |             |             |             | 0.55 ± 0.01   | 0.48 ± 0.05  | 0.58 ± 0.03   | 0.57 ± 0.03   |             |             |
| SURFACE (mm <sup>2</sup> )                          |             |               |              |             |             |             |             | 0.10 ± 0.02   | 0.10 ± 0.01  | 0.11 ± 0.01   | 0.10 ± 0.01   |             |             |
| <i>Mammillary tract (mt)</i>                        |             |               |              |             |             |             |             |               |              |               |               |             |             |
| FA  |             |               |              |             |             |             |             |               |              | 0.66 ± 0.02   | 0.67 ± 0.04   |             |             |
| SURFACE (mm <sup>2</sup> )                          |             |               |              |             |             |             |             |               |              | 0.032 ± 0.002 | 0.025 ± 0.004 |             |             |
| <i>Post commissural fornix (pf)</i>                 |             |               |              |             |             |             |             |               |              |               |               |             |             |
| FA  |             |               |              |             |             |             |             | 0.49 ± 0.01   | ND           | 0.57 ± 0.02   | ND            |             |             |
| SURFACE (mm <sup>2</sup> )                          |             |               |              |             |             |             |             | 0.032 ± 0.006 | ND           | 0.032 ± 0.003 | ND            |             |             |
| <i>Supraoptic decussation optic tract (sox/opt)</i> |             |               |              |             |             |             |             |               |              |               |               |             |             |
| FA  |             |               |              |             |             |             |             | 0.69 ± 0.02   | 0.62 ± 0.04  | 0.81 ± 0.01   | 0.70 ± 0.04   |             |             |
| SURFACE (mm <sup>2</sup> )                          |             |               |              |             |             |             |             | 0.35 ± 0.03   | 0.24 ± 0.01  | 0.29 ± 0.03   | 0.20 ± 0.04   |             |             |
|   |             |               |              |             |             |             |             |               | *(−31)       |               |               |             |             |
| <i>Cerebral peduncle (cp)</i>                       |             |               |              |             |             |             |             |               |              |               |               |             |             |
| FA  |             |               |              |             |             |             |             |               |              | 0.78 ± 0.02   | 0.77 ± 0.02   | 0.70 ± 0.02 | 0.70 ± 0.05 |
| SURFACE (mm <sup>2</sup> )                          |             |               |              |             |             |             |             |               |              | 0.58 ± 0.02   | 0.44 ± 0.03   | 0.71 ± 0.02 | 0.47 ± 0.01 |
|   |             |               |              |             |             |             |             |               |              |               | ** (−24)      |             | *** (−34)   |

Abbreviations: FA = fractional anisotropy; KO = knockout; ND = not determined; WT = wild type; ROI = region of interest. Percentages of significant changes between WT and KO mice are indicated in parentheses.  $n = 5$  WT and 5 KO. Student's  $t$ -test: \* $P < 0.05$ , \*\* $P < 0.01$  and \*\*\* $P < 0.001$ .

microstructure of fibres from the corpus callosum. No ultra-structural axonal differences were evident (Supplementary Fig. 1a). Quantification of the thickness and perimeter of myelin sheaths as well as of myelinated axonal surfaces revealed no difference between WT and MAP6-KO axons (Supplementary Fig. 1b). Thus, FA changes indicate possible axonal density reduction with an increase of extra-axonal compartment volume or defasciculation defects in some tracts rather than myelination defects.

Altogether this analysis indicates that MAP6 deletion induces heterogeneous defects affecting both the size and the integrity of the axonal tracts and highlighted an apparently specific function of MAP6 in one specific tract: the post-commissural fornix.

**MAP6 is required for fornix integrity.** The post-commissural fornix is the major efferent pathway of the hippocampal projection that originates from the subiculum<sup>37</sup> and terminates at the posterior hypothalamus in the mammillary body (Fig. 3a). To characterize in greater detail the changes in the anatomy of the post-commissural fornix in adult, the *Thy1-eYFP-H* transgene<sup>38,39</sup>, which is expressed by subicular neurons, was introduced in MAP6-KO mice by breeding. On coronal sections

of hippocampal formation including the dorsal subiculum (DS) from WT/ *Thy1-eYFP-H* and MAP6 KO/*Thy1-eYFP-H* adult mice, subicular neurons expressing eYFP were comparably distributed in the subiculum of both genotypes (Supplementary Fig. 2a,b) without change in density (Supplementary Fig. 2c). This indicates that subicular neurons, which project their axons in post-commissure, persist in MAP6-KO mice.

To visualize the entire fornix and analyze its axon bundling, we prepared sagittal slices with a cutting angle of 30° (Fig. 3b, coronal diagram). Panoramic views showed that the dorsal and the pre-commissural fornices, which contain fibres from Ammon's horn and septal part of the subiculum, are similar in WT and MAP6-KO mice (Fig. 3b, green framed panels). In contrast, the post-commissural fornix was shorter and thinner in MAP6-KO brain (Fig. 3b; green framed panels; observed in 3/3 MAP6-KO mice). Many MAP6-KO axons split unusually off from the fornix pathway and exhibit a chaotic organization with disordered and defasciculated axons as compared with WT (Fig. 3b, orange and blue framed panels). Accordingly, electron microscopy analysis of micro-dissected post-commissural fornices revealed clear axonal bundle defects in MAP6-KO brains (Fig. 3c). In MAP6-KO mice, most of the fornix fibres terminate scattered in the anterior hypothalamus, with only very few of



them able to reach their final target, the mammillary body (Fig. 3b, yellow framed panels and Supplementary Fig. 2d–g).

We then examined the morphology of single axons from the fornix by performing stereotaxic injections of lentivirus expressing GFP into dorsal subiculum neurons (Fig. 3d). WT mice exhibit straight axonal projections with a smooth aspect, while MAP6-KO projections are abnormal, more tortuous and present many varicosities (Fig. 3e,f; observed in 3/3 MAP6 KO mice). Again, in MAP6-KO mice, only very few fibres reach the mammillary body (Fig. 3g).

Together these results demonstrate a clear neuronal discontinuity in adult MAP6-KO mice brain, with the subiculum not properly connected to the hypothalamus.

**MAP6 regulates the embryonic development of the fornix.** We next asked whether defects in the descending post-commissural fornix reflect abnormal development or neurodegenerative processes. For this, we analysed the post-commissural fornix during neuro-development at embryonic day (E) 18.5 when the post-commissural fibres have reached their targets in the mammillary bodies. WT and MAP6-KO forebrains were double-immunostained with antibodies against the ubiquitous L1-CAM axonal marker and neuropilin1 (Nrp1), a semaphorin receptor enriched in subicular projections<sup>36</sup>. Results reveal that the post-commissural fornix is altered in KO embryos with a progressive reduction of axonal density from the column to the post-commissural part of the fornix and an absence of axonal projections after the anterior commissure (Fig. 4a and Supplementary Fig. 3; phenotype observed in 4/4 MAP6-KO mice and 0/4 WT mice). Similar results were obtained using DiI tracing of subicular neurons (Fig. 4b–e, phenotype observed in 2/2 MAP6 KO and 0/3 WT mice). Altogether, the post-commissural fornix does not form properly during neurodevelopment in the absence of MAP6 protein.

**MAP6 is involved in Sema3E- growth promoting activity.** The absence of the postcommissural fornix in MAP6 KO is reminiscent of the phenotype of Sema3E-KO embryos<sup>36</sup>. Sema3E acts as an attractive and growth-promoting signal for axons of subicular neurons<sup>36</sup>. We therefore evaluated MAP6 function in the axonal response to Sema3E in cultured subicular neurons, which predominantly expressed the MAP6-E isoform (Supplementary Fig. 4a).

As previously reported<sup>36</sup>, application of Sema3E (5 nM) to WT cultured subicular neurons electroporated with siRNA control for

24 h, induced a 1.3-fold increase in axon length (Fig. 5a). When subicular neurons were treated with MAP6 siRNAs to knockdown MAP6 proteins (Supplementary Fig. 4b) they failed to respond to Sema3E (Fig. 5a). The co-electroporation of siRNAs and a cDNA coding for MAP6-E (resistant to siRNA) rescued the stimulation effect of Sema3E (Fig. 5a). Experiments performed with WT and MAP6-KO subicular neurons yielded to similar results with a 1.5-fold increase in the axon length in WT and no response in MAP6-KO neurons (Fig. 5b). The transfection of MAP6-E cDNA into MAP6-KO subicular neurons fully rescued the growth-promoting activity of the Sema3E (Fig. 5c). To determine whether MAP6 is involved in axonal guidance, explants of subiculum from WT and MAP6 KO brains were co-cultured with aggregates of HEK293T17 cells expressing Sema3E (Fig. 5d). Whereas WT subicular axons were attracted to Sema3E, MAP6-KO axons were unresponsive to this cue. These results clearly indicate that MAP6 protein contributes to the Sema3E-induced growth and guidance of subicular axons.

Sema3E is a bifunctional molecule, which in addition to its promoting effect on subicular axons can also inhibit growth of cortical axons<sup>36</sup>. However, despite a similar expression pattern of MAP6 isoforms between cultured subicular and cortical neurons (Supplementary Fig. 4a), the inhibition of MAP6 expression using siRNAs or the absence of MAP6 in KO neurons did not alter Sema3E responsiveness of cultured cortical neurons (Fig. 5e,f).

Together these results indicate a specific role for MAP6 in the growth promoting and attractive activity of Sema3E on subicular neurons and not in cortical neurons.

To estimate a possible *in vivo* genetic cooperation between MAP6 and Sema3E during fornix development, we performed analyses of trans-heterozygous animals. The fornix was analysed, from anterior commissure to mammillary bodies at P1. A strong delay of fornix formation was observed in double Sema3E/MAP6 heterozygous animals stronger than in single MAP6 or Sema3E heterozygous mice (Supplementary Fig. 5a–c). Furthermore, the defect in post commissural fornix persisted in P21 double heterozygous with a strong defasciculation (Supplementary Fig. 5d, arrows).

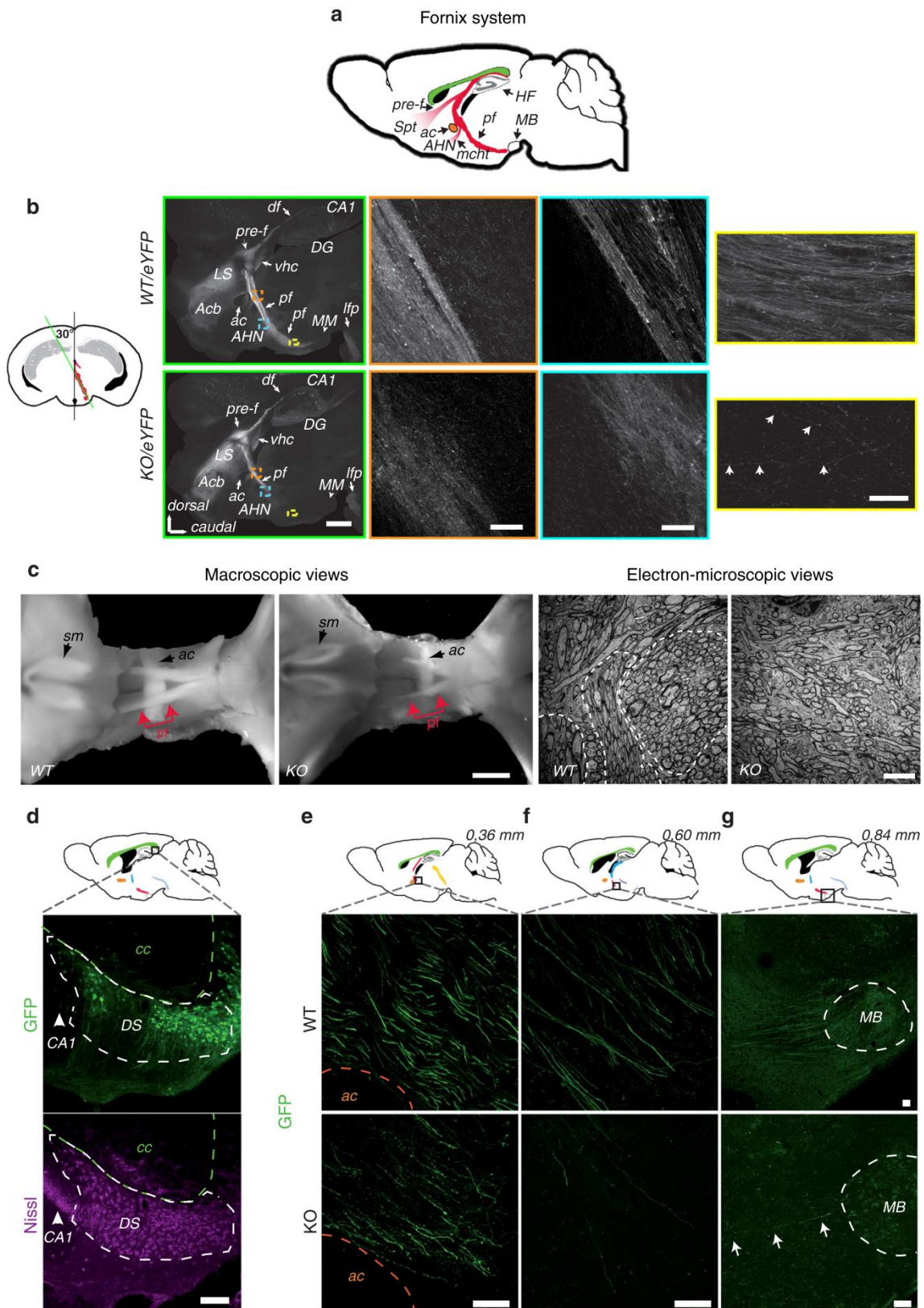
The fornix defects found in double heterozygous animals, but not in single heterozygous mice, are strong indicators of *in vivo* cooperation of MAP6 and Sema3E during fornix development.

**The Sema3E receptors are functional in MAP6-KO mice.** To begin to understand the mechanism by which MAP6 controls axonal response to Sema3E, we examined the expression of the

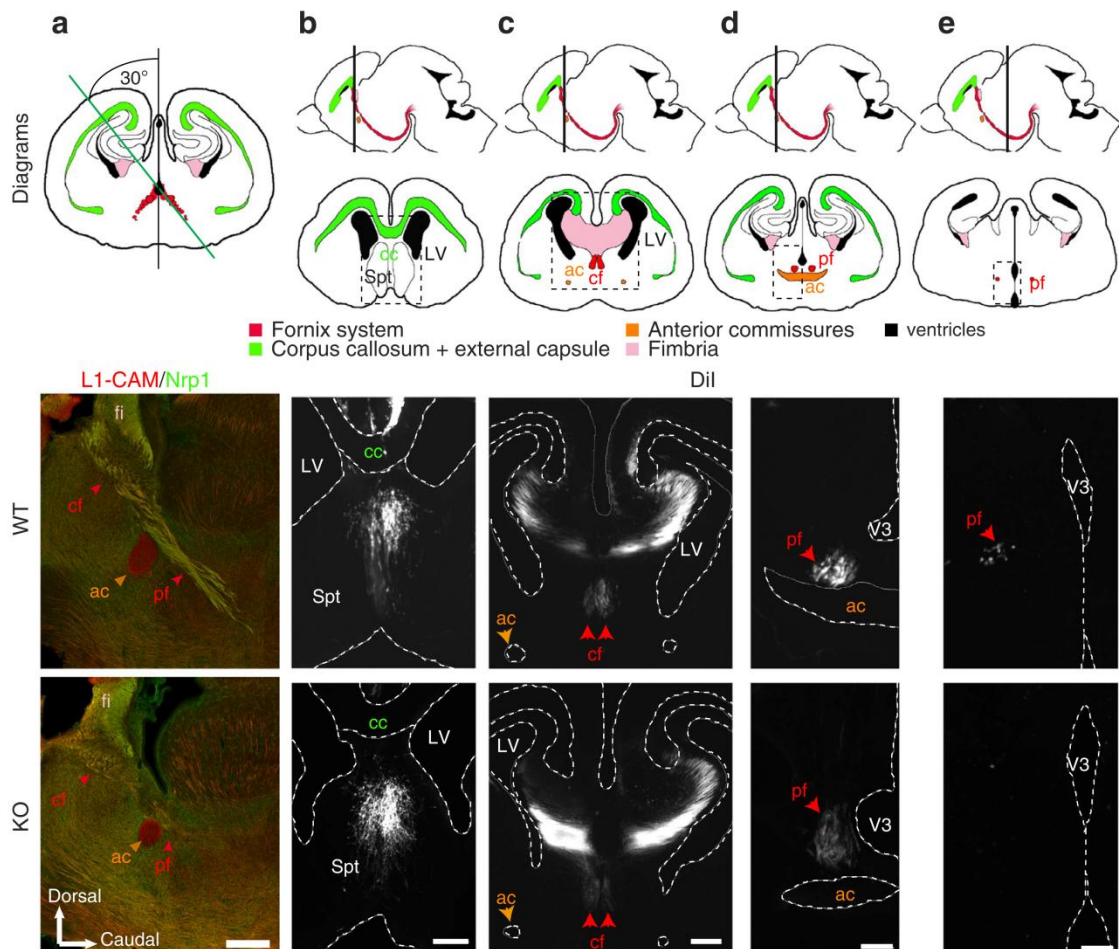
**Figure 3 | Disruption of the post-commissural fornix in MAP6-KO mice.** (a) Schematic representation of the fornix system (in red) on a sagittal diagram. (b) Diagram showing in red, the projection stack of post-commissural fornix. The green line indicates the plane of the transverse sections (30°) shown in panels framed in green. Panoramic views of epifluorescence observed in WT/Thy1-eYFP-H (upper) and MAP6-KO/Thy1-eYFP-H brains (lower) are shown in green framed panels, scale bar, 1 mm. Orange, blue and yellow-framed panels represent confocal images corresponding to coloured squares drawn in the panoramic view. Images are the maximal projection stack of 10 confocal sections, separated by 0.95 µm. In yellow framed panels, arrows indicated the presence of some rare axonal projections reaching the mammillary body. Scale bars, 20 µm. (c) Dorsal macroscopic views showing the hypoplasia of MAP6-KO post-commissural fornices. Portions of post-commissural fornix used for electron microscopy studies are indicated in red, scale bar, 0.5 mm. Representative electron-microscopic views of transverse sections of post-commissure fornices of WT and MAP6-KO mice. In WT tight clusters of axons can be seen (dotted areas) not in MAP6-KO mice, scale bars, 5 µm. (d) A schematic sagittal section indicates the site of lentivirus stereotaxic injection in dorsal subiculum (square). Confocal images of the injection site (2 weeks post injection) show GFP-expressing pyramidal neurons in dorsal subiculum (green) and Nissl counterstaining (cyan). Scale bar, 100 µm. (e–g) Schematic diagrams of sagittal planes at 0.36, 0.60 and 0.84 mm interaural indicate the position of microscopic fields corresponding to confocal images (black square). Major neuronal tracts are schematized (colour code in Supplementary Fig. 3). Confocal images show the post-commissural axonal projections expressing GFP (green) in WT and MAP6-KO mice. In MAP6-KO mice, only some rare axons reached the mammillary body (g, arrows). Scale bars, 40 µm. Acb = accumbens nucleus; ac = anterior commissure; AHN = anterior hypothalamic nucleus; CA1 = field Corn d'Ammon1 of the hippocampus; df = dorsal fornix; DS = dorsal subiculum; DG = dentate gyrus; HF = hippocampal formation; LS = lateral septal nucleus; mcht = medial corticohypothalamic tract; lfp = longitudinal fasciculus of the pons; MB = mammillary bodies; MM = medial mammillary nucleus medial part; pre-f = pre-commissural fornix; pf = post-commissural fornix; sm = stria medularis; Spt = septum; vhc = ventral hippocampal commissure.

Sema3E receptor complex in MAP6-KO mice. Attractive effect of Sema3E on axonal growth depends on binding to a receptor complex composed of PlexinD1 (PlxD1), Neuropilin1 (Nrp1) and the vascular endothelial growth factor receptor 2 (VEGFR2); PlxD1 being the binding subunit and VEGFR2 the signal

transducing subunit<sup>35</sup>. We determined PlxD1 receptor expression in the subiculum of WT and MAP6 KO E17.5 embryos by *in situ* hybridization and found no obvious differences (Fig. 6a). Accordingly, we observed a clear binding of Sema3E-alkaline phosphatase fusion protein (Sema3E-AP) to brain sections of WT







**Figure 4 | Absence of the post-commissural fornix in E18.5 MAP6-KO embryos.** (a) Sagittal sections with a cutting angle of 30° of E18.5 WT and KO brain were double immunostained with anti L1 CAM and Neuropilin1 (Nrp1). A diagram shows the projection stack of post-commissural fornix in red on a coronal plan. The green line indicates the plane of the sagittal sections. Note that the size of the anterior commissure is strongly reduced and the post-commissural fornix is absent. Scale bars, 300  $\mu$ m. (b–e) Coronal section of E18.5 WT and MAP6-KO brain after anterograde Dil tracing of the fornix from the subiculum. For each panel, a sagittal diagram shows the projection stack of post-commissural fornix in red and a grey line indicates the level of coronal plan. Dashed square indicates the position of microscopic field. Scale bars, b, c 100  $\mu$ m; d, e 50  $\mu$ m. ac = anterior commissure; cc = corpus callosum; cf = column of the fornix, fi = fimbria; LV = lateral ventricle; pf = post-commissural fornix; Spt = septum; V3 = third ventricle.

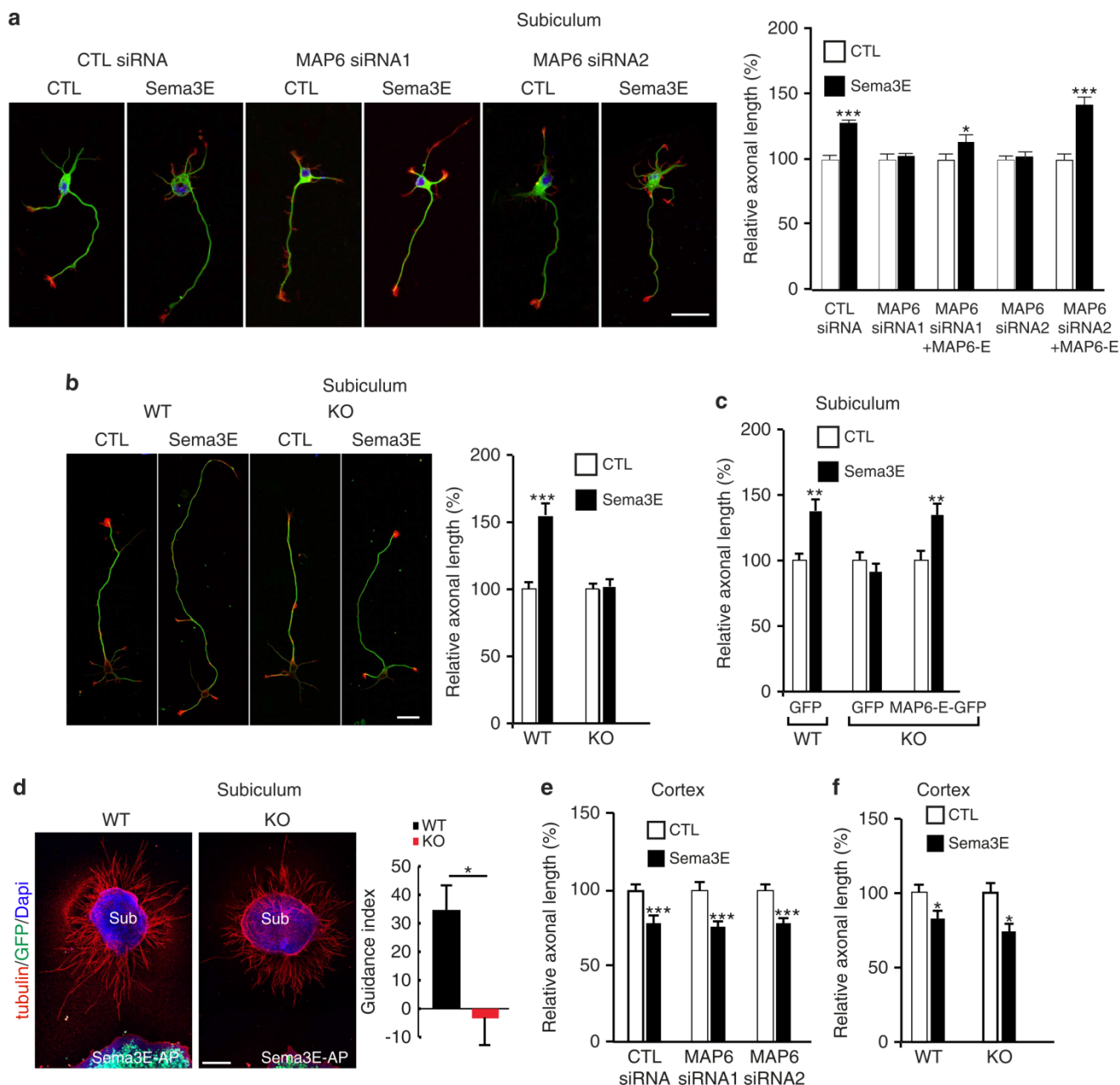
and MAP6-KO embryos. *Sema3E*-AP labelled several axonal tracts, including anterior commissure, mammillo-thalamic tract and post commissural part of the fornix (Fig. 6b), although the staining was less intense in MAP6-KO brain slices due to the size reductions of axonal tracts. Thus, *Sema3E* can properly bind to its receptor in MAP6-KO brain. We then investigated the expression pattern of *PlxD1*, *Nrp1* and *VEGFR2* proteins, in MAP6-KO subicular neurons by quantitative immunofluorescence (Fig. 6c). In the absence of MAP6, *PlxD1*, *Nrp1* and *VEGFR2* expression levels were not altered (Fig. 6c).

In subicular neurons, *Sema3E* initiates intracellular signalling through *VEGFR2*, with phosphorylation of *VEGFR2* tyrosine-1175 being an early event<sup>35</sup>. Using quantitative immunofluorescence, we found that *Sema3E* exposure increases *VEGFR2* phosphorylation in both WT and MAP6-KO neurons (Fig. 6d). Therefore, the functional defect in MAP6-KO subicular neurons is likely to occur in post-receptor signalling.

**MAP6 interacts with components of the *Sema3E* receptor complex.** We next looked for a possible interaction of MAP6 with the *Sema3E* receptor complex. *PlxD1*, *Nrp1* and *VEGFR2* cDNAs were simultaneously expressed in HEK293T17 cells in

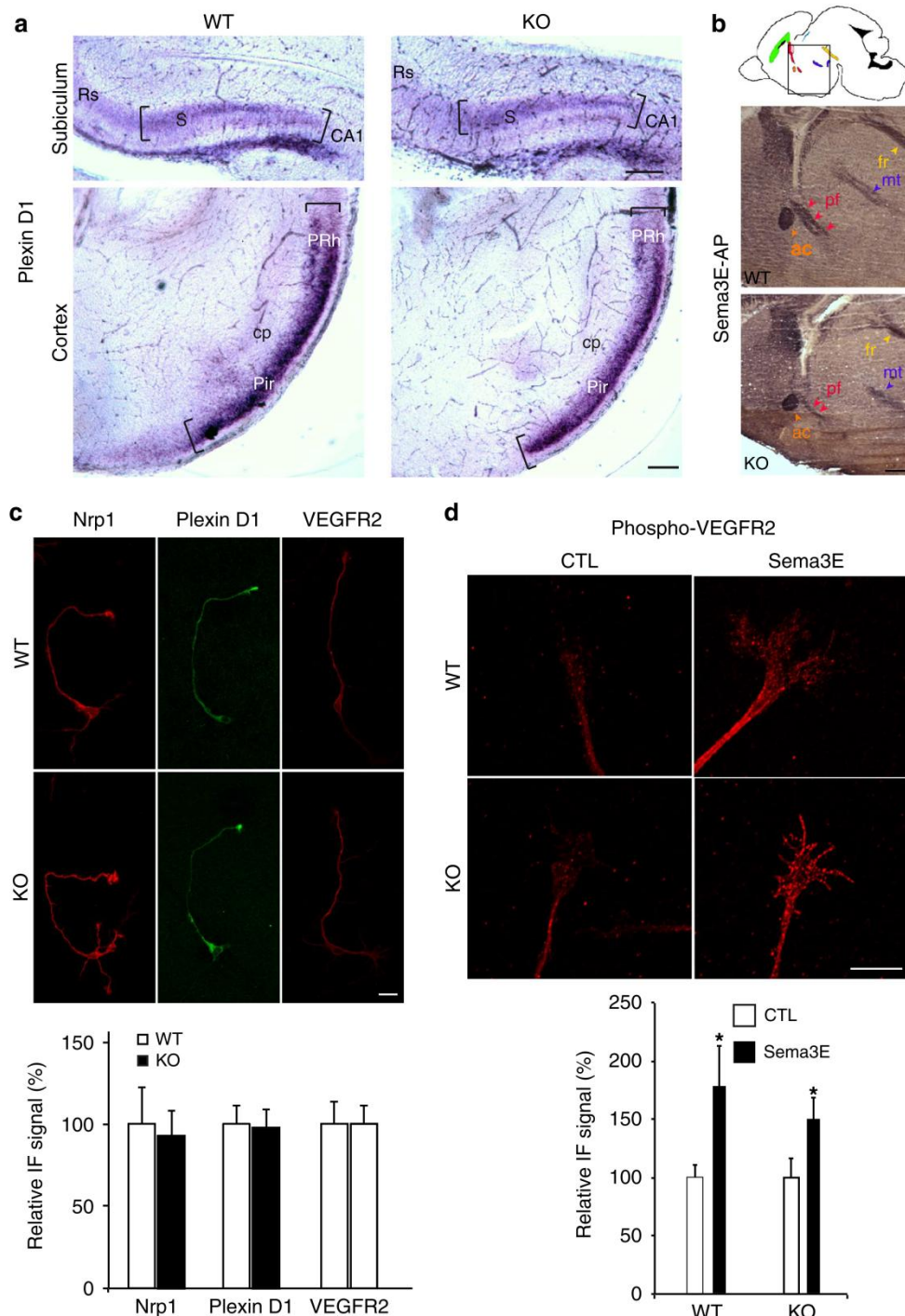
combination with MAP6-E-GFP. In *PlxD1* immunoprecipitates, we were able to detect *Nrp1*, *VEGFR2* and MAP6-E-GFP proteins (Fig. 7a and Supplementary Fig. 6). Similar results were obtained when the immunoprecipitation was performed with an *Nrp1* antibody (Supplementary Fig. 7a). In additional experiments *PlxD1*, *Nrp1* and *VEGFR2* cDNAs were individually expressed in HEK293T17 cells in combination with MAP6-E-GFP. We were able to detect MAP6 protein in *PlxD1*, *Nrp1* and *VEGFR2* immunoprecipitates (Supplementary Fig. 7b). We next determined whether the interaction of MAP6 with the *Sema3E* receptor occurs in cultured subicular neurons. Indeed, we were able to detect *Nrp1* in MAP6 immunoprecipitates (Fig. 7b and Supplementary Fig. 7c). In control experiments using MAP6-KO neurons, *Nrp1* was not detected. Together the data indicate that MAP6 is associated with the *Sema3E* tripartite receptor.

**MAP6 proline-rich domains and *Sema3E* promoting growth ability.** To determine whether MAP6 participates in *Sema3E* signalling through its MT-binding inactivity we performed rescue experiments on cultured MAP6 KO subicular neurons using GFP-tagged MAP6-E mutants (Fig. 7c and Supplementary Fig. 8). As found previously (Fig. 5c), MAP6-E-GFP was able to rescue



**Figure 5 | MAP6 is required for the growth-promoting activity of Semaphorin 3E on subicular neurons.** (a) Typical images of subicular neurons cultured in the absence (CTL) or in the presence of 5 nM Sema3E for 24 h, electroporated with GFP-expressing vector and control siRNA or MAP6 siRNAs. To measure the axon length, neurons were stained with anti- $\alpha$ -tubulin (green) and phalloidin (red). Scale bar, 30  $\mu$ m. The histogram shows quantifications of the relative axonal length in subicular neurons in the absence (CTL) or the presence of 5 nM recombinant Sema3E (Sema3E). Error bars, s.e.m., values corresponded to mean axonal length (measured in at least 60 neurons for each condition) and normalized to 100% for values obtained in control conditions. (b) Typical images of WT and MAP6-KO dissociated subicular neurons cultured in the absence (CTL) or the presence of 5 nM Sema3E. Scale bar, 30  $\mu$ m. The histogram shows quantifications of relative axonal length of cultured subicular neurons in the absence (CTL) or the presence of 5 nM recombinant Sema3E. Error bars, s.e.m., values corresponded to mean axonal length (measured in at least 60 neurons for each condition) and normalized to 100% for values obtained in control conditions. (c) The histogram shows quantifications of relative axonal length after exogenous expression of rat MAP6-E-GFP. Error bars, s.e.m., values corresponded to mean axonal length (measured in at least 60 neurons for each condition) and normalized to 100% for values obtained in control conditions. (d) Sema3E axonal guidance response. Representative images of subiculum (Sub) explants from E17.5 WT or KO embryo co-cultured in a plasma clot with an aggregate of HEK cells transfected with Sema3E-AP and GFP. Scale bar, 200  $\mu$ m. Quantification of the guidance response, graph shows mean guidance index (see methods) calculated for each condition (WT,  $n = 11$  and KO,  $n = 8$ ). Positive values indicate attraction. (e) Quantifications of axonal length in cultured cortical neurons in the absence or the presence of 5 nM recombinant Sema3E electroporated with GFP-expressing vector and control siRNA or MAP6 siRNAs. Error bars, s.e.m. Values corresponded to mean axonal length (measured in at least 60 neurons for each condition) and normalized to 100% for values obtained in control conditions. (f) Quantifications of axonal length in cultured WT and MAP6-KO cortical neurons in the absence (CTL) or the presence of 5 nM recombinant Sema3E. Error bars, s.e.m., values corresponded to mean axonal length (measured in at least 60 neurons for each condition) and normalized to 100% for values obtained in control conditions. All quantifications have been repeated at least three times using independent neuronal cultures yielding consistent results. \* $P < 0.05$ ; \*\* $P < 0.01$ ; \*\*\* $P < 0.001$ ; Student's  $t$ -test (5a,b,c,e,f); non-parametric Mann-Whitney  $U$ -test (5d).





**Figure 6 | The Sema3E receptors (PlexinD1/Neuropilin1/VEGFR2) expression in developing MAP6-KO brain and in cultured subicular neurons. (a)** Coronal brain slices of WT and MAP6-KO E17.5 embryos were hybridized with probes for PlxD1. PlxD1 mRNA is expressed in the subiculum and in the ventrolateral part of the cortex including the piriform cortex and the perirhinal cortex. Scale bar, 100  $\mu$ m. S = subiculum; CA1 = Ammon's Horn; cp = cerebral peduncle; Rs = retrosplenial cortex; Pir = piriform cortex; PRh = perirhinal cortex. **(b)** Binding of sema3E along the fornix. Schematic diagram of a sagittal section with major neuronal tracts indicated (colour code in supplementary Fig. 3). The square indicates the position of microscopic field shown below. The atrophic fornix post-commissural part (pf) observed in MAP6-KO embryos binds Sema3E-AP. **(c)** Immunolabelling of subicular neurons using anti-PlxD1, -Nrp1 and -VEGFR2 antibodies. Histogram shows quantification of the relative immunofluorescence signal. The values represent the mean pixel intensity of the staining (number of neurons  $\geq$  60). Scale bar, 20  $\mu$ m. **(d)** Immunolabelling of growth cones from subicular neurons using anti-phosphotyrosine antibody to Tyr1175 in VEGFR2 after 15 min of treatment with 10 nM of Sema3E. Histogram shows the mean pixel intensity of phospho-VEGFR2 staining relative to CTL conditions (number of growth cones  $\geq$  20). Scale bar, 10  $\mu$ m. Error bars, s.e.m. \* $P$  < 0.05 Student's *t*-test.

growth-promoting activity of Sema3E, whereas GFP control protein could not rescue (Fig. 7c). We then designed MAP6-E mutants devoid of MT-binding domains and evaluated their

ability to rescue the growth-promoting activity of Sema3E. MAP6 proteins contain two types of MT-binding domains, the Mc modules in the central domain (in grey, Fig. 7c) and the Mn

modules (in orange, Fig. 7c). As expected mutant lacking both sets of modules, MAP6-E- $\Delta$ Mn $\Delta$ Mc-GFP, failed to bind MTs (Supplementary Fig. 8). However, this mutant rescued the growth-promoting activity of Sema3E (Fig. 7c). Similarly, MAP6-E lacking either MT-binding domain Mn or Mc (MAP6-E- $\Delta$ Mn-GFP or MAP6-E- $\Delta$ Mc-GFP) also rescued the growth-promoting activity of Sema3E (Fig. 7c). These results clearly indicate that MAP6 ability to bind MTs is not required for its role in Sema3E growth promotion.

**MAP6 interacts with SH3 domain containing proteins.** Sema3E growth promotion involves VEGFR2 activation, which triggers the recruitment and the activation of SH2 and/or SH3 domain containing proteins such as PI3K<sup>35,40,41</sup>. In its N-terminal domain, MAP6-E contains stretches of proline residues, which are likely candidates for interaction with SH3-containing proteins, and it is known that MAP6 binds to the SH3-A domain of intersectin1<sup>42</sup>. We therefore deleted a proline-rich domain (PRD) of MAP6-E (MAP6-E- $\Delta$ PRD<sub>39-57</sub>). This mutant retains a MT-binding activity (Supplementary Fig. 8) but failed to rescue the growth-promoting activity of the Sema3E (Fig. 7c). Therefore, the ability of MAP6 to mediate Sema3E signalling via Plx1/Nrp1/VEGFR2 requires the proline-rich domain (PRD<sub>39-57</sub>) and suggests that MAP6 interaction with SH3 domain-containing proteins is crucial for Sema3E growth-promoting activity.

We then performed a large screen to identify SH3 domain-containing proteins able to interact with MAP6 (Fig. 7d and data not shown). Lysates of isolated mouse brain were incubated with a variety of recombinant GST-SH3 protein domains. The two neuronal MAP6 isoforms (MAP6-E and MAP6-N) that both contain the PRD domain interacted with a broad range of SH3 domains to markedly varying extents. MAP6 strongly interacted with two SH3 domains of intersectin1 (ITSN1) and with the p85 subunit of PI3K (Fig. 7d), a protein involved in the neuronal VEGFR2 signalling pathway<sup>35</sup>.

We further analysed MAP6 interaction with intersectin1 and the p85 subunit of PI3K using the converse pull-down assays. A fragment of MAP6 protein corresponding to the N-terminal part of the protein (LNt fragment) that contains the proline-rich domain (PRD<sub>39-57</sub>) coupled to GST was produced. Analysis of pull-downs performed with brain lysates revealed that GST-LNt fragment associated with intersectin1 isoforms and with the p85 subunit of PI3K (Fig. 7e). Furthermore, as p85 subunit of PI3K is endogenously expressed in HEK 293T17 cells, we analysed its presence in MAP6 immunoprecipitates performed on HEK 293T17 cells and detected it as shown in Supplementary Fig. 7d. As the PI3K effector, Akt is phosphorylated in the Sema3E pathway<sup>35</sup>, we then measured Akt phosphorylation following Sema3E exposure in WT and MAP6-KO subicular neurons. While Sema3E application increased the phosphorylation of Akt in WT neurons, it had no effect on MAP6-KO neurons (Fig. 7f). These results suggest that following Sema3E exposure, MAP6 might couple the Sema3E receptors to PI3K for activation of the Akt pathway.

## Discussion

Our study reveals a signal transduction role for MAP6, a protein previously known mainly for its MT stabilization ability, in promotion of axon growth in specific axon tracts in the developing brain. MAP6 associates with the Sema3E receptor complex and MAP6 PRD<sub>39-57</sub> domain is crucial for Sema3E signalling. The ability of MAP6 to interact with multiple SH3 domain-containing proteins including PI3K and intersectin, known to be triggered in signalling cascades after Sema3E

receptors activation, is most probably crucially involved in Sema3E signalling. This signalling role for MAP6 explains the specific phenotype observed in MAP6-KO mice. The mice did not exhibit generalized deficits expected to be associated with loss of MT stabilization, but rather they fail to develop a highly specific axonal tract involved in cognitive deficits due to the loss of MAP6's ability to transduce signals from the Sema3E receptors complex in subicular neurons. Our data potentially explain the cognitive defects in MAP6-KO mice and highlight the major role of this signalling pathway in a key element of brain development.

MAP6-KO mice displayed a large spectrum of behavioural and cognitive impairments associated with neurotransmission and synaptic alterations<sup>23,28,30,43</sup>, which have been shown to positively respond to long-term typical and atypical neuroleptic treatment<sup>23,31,32</sup>. These features are reminiscent of human psychiatric diseases and MAP6-KO mice have been proposed to be a useful animal model for some aspects of the pathophysiology of psychiatric diseases including schizophrenia. Before the present study, nothing was known about how MAP6 contributes to these key neurodevelopmental processes. By performing the first precise analysis of MAP6-KO mice brain anatomy, we showed that MAP6 deletion strongly reduced brain volume and is accompanied by ventricle enlargement. Alteration of brain size is well documented in human psychiatric disorders<sup>1,2</sup>. Our general DTI data showed that the reduction of brain volume is associated with white matter defect, affecting several axonal tracts within the brain. Similar white matter abnormalities and related abnormal connectivity are also found in some brain regions of schizophrenic or bipolar patients<sup>3-6</sup>. This suggests that the anatomical changes observed in MAP6-KO mice may account for their schizophrenia-like behavioural and cognitive impairments.

Images from DTI and histological analyses revealed key defects in neuronal connectivity in MAP6-KO mice. Indeed, some axonal tracks such as the anterior commissure, the internal capsule, the cerebral peduncle and the fornix are severely affected either in their size and/or in their microstructures as detected by FA changes. The fornix is mostly composed from the axons of subicular neurons and was the most deficient tract, with a quasi disappearance of the post-commissural part. The inability of subicular neurons to sense Sema3E signalling in the MAP6-KO mice is likely to be the main contributor to the posterior fornix defect. Indeed, subicular neurons failed to respond to Sema3E growth promoting activity and axonal guidance. Furthermore the double Sema3E/MAP6 heterozygous animals exhibited a delay in fornix formation and a strong defasciculation in the posterior part of the fornix in adult mice. The fornix defects in MAP6-KO brain are more severe than those observed in Sema3E-KO mice, which exhibit only latency in fornix formation associated with a defasciculation, strongly suggesting that additional molecular defects might be involved.

Our results indicate that MAP6 is not involved in the repulsive growth activity of Sema3E on cortical neurons; however, some cortical tracts were found abnormal with defasciculation (corpus callosum, internal capsule) indicating possible additional functions for MAP6.

Fornix disruption in MAP6-KO brains resulted in a disconnection between the hippocampus and the hypothalamus and this impaired connectivity most likely contributes to the observed behavioural disorders. The fornix belongs to the Papez circuit known to be involved in cognitive and memory abilities for review<sup>44</sup>. MRI and in particular DTI methods in humans report similar connectivity defects in schizophrenic patients with disrupted fornix integrity<sup>45-49</sup> associated with alterations of resting state functional connectivity<sup>50</sup> and defective memory organization<sup>51,52</sup>. Other links between abnormal neuronal axonal



tract formation and specific genes have been reported in both animal models and patients. For example, defective schizophrenia-related genes such as *DISC1*<sup>53,54</sup>, *dysbindin*<sup>55,56</sup> and *neuregulin*<sup>57</sup> are linked to abnormal brain connectivity. Thus, abnormal tract formation and white matter defects, easily detectable by the DTI technique in humans, might be seen as a convergent consequence of a specific gene mutation in psychiatric disorders.

Sema3E binds to the PlexinD1 receptor both in cortical and subicular neurons, but signalling from here depends on a variety of co-receptor configurations. Thus, in cortical neurons PlexinD1 receptors act alone and promote growth cone collapse mainly through deactivation of R-Ras<sup>58</sup>. In contrast, Plexin D1 in subicular neurons is associated with both Neuropilin1 and VEGFR2, the signalling component being VEGFR2 rather than PlexinD1. MAP6-KO cortical neurons responded normally to Sema3E, whereas the subicular neurons did not respond, indicative of a defect in the VEGFR2 transducing pathway. We found that Sema3E is unable to trigger the PI3K/Akt pathway in MAP6-KO neurons, which is required for increased axonal growth. Our results suggest Sema3E binding to the extracellular domain of Plexin D1 allows the transactivation of VEGFR2 as indicated by its auto-phosphorylation, and the binding of MAP6 to the tripartite PlxD1/Nrp1/VEGFR2 receptor. Furthermore, MAP6, through a proline-rich domain, can recruit to the receptor some signalling SH3 domain-containing proteins, including the p85 subunit of PI3K, to facilitate lipid phosphorylation and consequent recruitment and activation of the Akt kinase signalling pathway for the promotion of axonal growth.

MAP6 protein contains several stretches of proline residues and we demonstrate the importance of the PRD<sub>39-57</sub> domain in Sema3E signalling. We also showed that MAP6 is able to interact with several SH3 domains-containing proteins, including intersectin1 and p85 (PI3K). This ability of MAP6 to bind SH3 domains-containing proteins is shared with other structural MAPs. MAP2 and tau bind SH3 domain proteins such as Grb2, Fyn and cSrc<sup>59-61</sup> but the physiological relevance of such interactions for neuronal function has never been clearly established. In the case of MAP6, we identify a physiological mechanism that involves the interaction between a structural MAP and SH3 domain signalling proteins. Indeed the PRD<sub>39-57</sub> domain of MAP6 is required to allow Sema3E growth-promoting activity on subicular neurons and fornix formation. By interacting with the tripartite PlxD1/Nrp1/VEGFR2 receptor and SH3 domain proteins, MAP6 might couple receptor activation to downstream Akt signalling pathways, providing a potential molecular explanation for its novel role in development of the fornix.

The requirement of MAP6 protein for proper axonal extension of subicular neurons through the integration of guidance cues might be shared by other MAPs. Indeed some MAPs have been

reported to influence axonal growth and axonal tracts formation such as doublecortin and MAP1B, which regulate hippocampal and corpus callosal development<sup>62,63</sup>, but the implication or not of their ability to bind MTs in these functions was not specifically analysed.

Overall, our study demonstrates a new axon guidance cue integration role for MAP6 in mediating signal transduction from a specific PlxD1/Nrp1/VEGFR2 receptor complex that mediates axonal growth in neurons possessing this unique receptor combination. MAP6 signalling is required for growth of a subset of brain neurons, notably the subicular axons, which in turn are required for wiring of the post-commissural part of the fornix during brain development. Together our data implicate MAP6 in neurodevelopment of specific brain axon tracts that are involved in cognitive abilities throughout life.

## Methods

**Animals.** Homogeneous inbred C57BL6/129SvPas-F1 mice were obtained by crossing MAP6 pure heterozygote 129SvPas male or female mice with MAP6 pure heterozygote C57BL6 male or female mice. The heterogeneous non-inbred BALBc/129 SvPas-F2 mice were obtained first by crossing BALBc with pure heterozygote 129SvPas MAP6 mice, then by crossing heterozygote BALBc/129 SvPas-F1 offspring together. Th1-eYFP line H mice<sup>88</sup> were obtained from Jackson Labs (B6.Cg-Tgn (Thy-YFP-H) 2Jrs) and crossed with pure heterozygote C57BL6 MAP6 mice to generate C57BL6/Thy1-eYFP MAP6 mice colony. These mice were then crossed with heterozygote 129SvPas MAP6 to generate WT/ and KO/Thy1-eYFP-H littermate mice in homogeneous inbred C57BL6/129 SvPas-F1. Double heterogeneous Sema3E/MAP6 mice were obtained either by the crossing of C57BL6 Sema3E<sup>+/-</sup> and 129vPas MAP6<sup>+/-</sup> mice or C57BL6 Sema3E<sup>+/-</sup> and C57BL6/Thy1-eYFP MAP6<sup>+/-</sup> mice. Male and/or females mice were used between 2-4 months old. In accordance with the policy of the Institut des Neurosciences de Grenoble (GIN) and the French legislation, experiments were done in compliance with the European Community Council Directive of 24 November, 1986 (86/609/EEC). The research involving animals was authorized by the Direction Départementale de la protection des populations—Préfecture de l'Isère-France (Deloulme J. C., PhD, permit number 380822) and by the ethics committee of GIN n 004 accredited by the French Ministry for of Research.

**Magnetic resonance imaging.** MRI was performed at 7T Bruker Biospec Avance III using a volume transmit/surface receive coil combination. The anaesthetized animal (1.5% isoflurane in air) was placed in heated cradle whose temperature was regulated at 37 °C. T2-weighted spin-echo images (TR/TE = 5,000/42 ms, field of view = 25 × 25 mm<sup>2</sup>, slice thickness = 0.6 mm, 29 slices) were obtained across the entire brain (from the cerebellum to olfactory bulb). The scan duration was 11 min/animal. Subsequently, the following contours were manually delineated on the T2-weighted images: brain, ventricles.

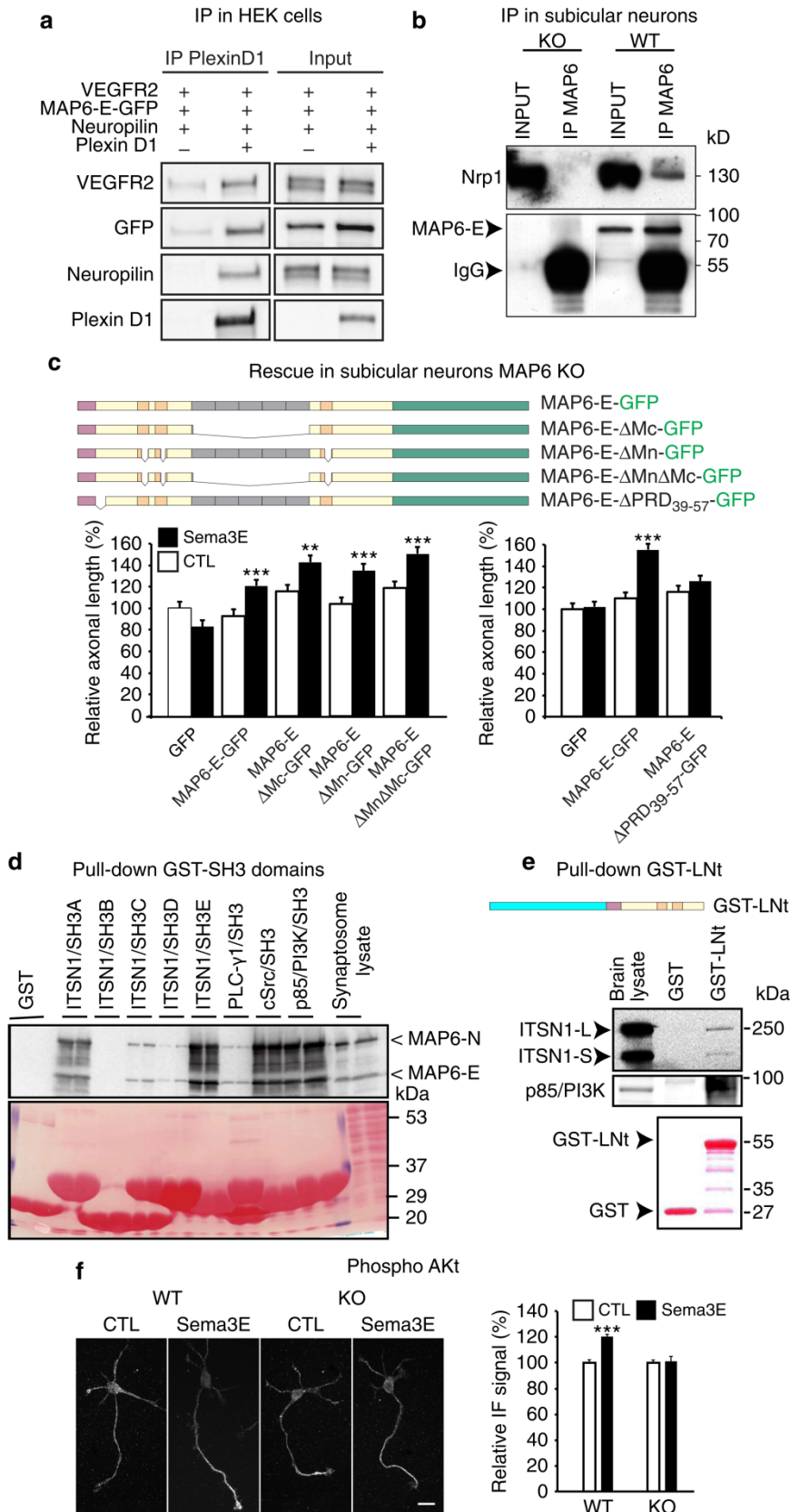
**Diffusion tensor imaging.** DTI experiments were carried out with the same MRI equipment. The DTI technique is based on water diffusion measurements in different spatial directions to assess the medium anisotropy. The FA parameter is derived from DTI measurements and describes voxel by voxel, the rate of anisotropy of water mobility that can be free or restricted in a given spatial direction. In GM and ventricles, water molecules diffuse without preferential direction and the FA value tends toward 0 while in white matter the FA value tends towards 1 describing a high medium anisotropy. Indeed water diffusion is free along fibre bundles (maximal diffusivity) and restricted perpendicularly (minimal diffusivity).

Technically, adult WT and MAP6-KO mice were perfused transcardially with

**Figure 7 | MAP6 protein is involved in the Sema3E signalling pathway.** (a) Immunoprecipitation of MAP6-E-GFP and Sema3E receptor proteins. HEK 293T17 cells were transfected with MAP6-E-GFP, VEGFR2, Plexin D1 or Neuropilin1 cDNAs. Immunoprecipitation was performed using a polyclonal anti-PlxD1 antibody. In control experiments, Plexin D1 cDNA was omitted. (b) Immunoprecipitation of endogenous MAP6-E from subicular neurons using an anti-MAP6 23N antibody. (c) Rescue experiments on MAP6-KO neurons by MAP6-E-GFP constructs and Sema3E response. Schematic representation of MAP6-E-GFP, MAP6-E-ΔMnΔMc-GFP, MAP6-E-ΔMc-GFP, MAP6-E-ΔMn-GFP and MAP6-E-ΔPRD<sub>39-57</sub>-GFP constructs. Values correspond to mean axonal length and were normalized to 100% for values obtained in control conditions (GFP without Sema3E). All quantifications have been repeated at least three times using independent neuronal cultures yielding consistent results (number of neurons ≥ 70 in all conditions). Error bars, s.e.m. \*\**P* < 0.01; \*\*\**P* < 0.001 Student's *t*-test. (d) Immunoblot analysis of synaptosomal proteins eluted from glutathione-Sepharose columns containing GST or GST fused to SH3 domains from intersectin (ITSN1/SH3A-E domains), PLC-γ1, cSrc, and p85/PI3K. The blot was stained with Ponceau red and probed with 23N antibody. (e) Immunoblot analysis of postnatal brain proteins eluted from glutathione-Sepharose columns containing GST and GST-MAP6 Lnt fragment containing the PRD<sub>39-57</sub> domain. Blots were stained with Ponceau Red and probed with anti-p85 or anti-intersectin antibodies. (f) Immunolabelling, using anti-phospho-Akt antibodies, of subicular neurons treated 15 min with 10 nM of Sema3E. Histogram shows the relative immunofluorescence signal of phospho-Akt staining within axons and growth cones (number of neurons ≥ 60). Error bars, s.e.m. \*\*\**P* < 0.001.

saline followed by 4% paraformaldehyde (PFA) and imaged in an animal bed with ear bars and bite bar head fixation. *Ex vivo* diffusion-weighted images were acquired with a spin echo sequence in which two identical diffusion gradients were applied with a duration of  $\Delta = 4$  ms, and a separation time  $\Delta = 10$  ms. The repetition time and echo time were set to 2,000 and 35 ms, respectively. Six

diffusion-weighted images were acquired with a b-value of  $1,000 \text{ s mm}^2$  and applied along six different orientations: [110], [1-10], [011], [01-1], [101] and [-101]<sup>64</sup>. The reference image was acquired with b around  $50 \text{ s mm}^2$ . All images were acquired in a field of view of  $15 \text{ mm} \times 15 \text{ mm}$  and a matrix of  $256 \times 256$  leading to an in-plane spatial resolution of  $59 \mu\text{m} \times 59 \mu\text{m}$ . Seven contiguous coronal slices of  $0.7\text{-mm}$





thickness positioned between  $-3.2$  and  $2.7$  mm of the Bregma were acquired. Twelve signal averages were used for a total imaging time of  $\approx 12$  h. All DTI maps pixels by pixels (diffusivity, FA, colour maps, FA-weighted colour maps) were obtained using in house software written in Matlab (The MathWorks, Natick, MA). The ROIs (regions of interest) were carefully delineated on FA-weighted colour map on the basis of histology images guided by the paxinos atlas of mouse brain<sup>65</sup>.

**Brain histology.** Brains from adult C57BL6/129SvPas and C57BL6/129SvPas/Thy1-eYFP mice were fixed by transcardiac perfusion of a 4% PFA solution. Brains were extracted and stored in the same fixative solution at  $4^{\circ}\text{C}$ . Brains were sliced at  $30\ \mu\text{m}$  using vibratome (Leica, VT1000S) and mounted on Superfrost plus slides (Menzel-Gläser). Coronal sections and transversal sections with a cutting angle of  $30^{\circ}$  from C57BL6/129SvPas/Thy1-eYFP mice were stained with Nissl Neurotrace stain (Invitrogen) and observed with stereoscopic microscope (Nikon, AZ100M) and with confocal microscope (Zeiss, LSM 710). Coronal sections of C57BL6/129SvPas mice were stained using the gold method<sup>66</sup> and counterstained with cresyl violet. For the evaluation of subicular neuronal density, coronal section of Thy1-eYFP mice was immunostained with an NeuN antibody and eYFP-positive cells were quantified using an homemade ImageJ macro. In brief the dorsal subiculum ROI was drawn using the NeuN staining image and the eYFP local maxima intensity signal was detected after application of a bandpass filter. All the neuroanatomical abbreviations in this study were from ref. <sup>65</sup> except for pre-f, precommissural fornix; pf, postcommissural fornix, cf, column of the fornix; PVH, paraventricular hypothalamic nucleus; AHN, anterior hypothalamic nucleus. All morphometric measures were performed using ImageJ software.

Immunohistochemistry on E18.5 using L1-CAM (Millipore; 1:2,000) and Nrp1 (R&D system; 1:200) and anterograde DiI tracing of the fornix were carried out with small crystals of lipophilic tracer DiI placed in the dorsal hippocampus.

**Lentiviral axonal tracing.** Lentiviral vectors encoding the green fluorescent protein (GFP) was produced in 293T cells by transient calcium phosphate precipitation of a 4-plasmid system (packaging construct pCMVDR-8.92; pRSV-Rev plasmid, plasmid encoding the VSV-G envelop pMD.G; SIN-W-PGK-GFP transfer vector). In brief, the VSV-G pseudo-typed HIV-1 vector was concentrated by ultracentrifugation and resuspended in PBS with 1% bovine serum albumin. The viral particle content was determined by p24 antigen enzyme-linked immunosorbent assay (RETROtek; Gentaur, Paris, France). The batches were stored at  $-80^{\circ}\text{C}$  until use. Concentrated viral batch were thawed on ice and resuspended by vortexing and repeated pipetting and diluted to a concentration of  $490\ \text{ng p24 antigen}/\mu\text{l}$ . Mice received a total volume of  $0.75\ \mu\text{l}$  of the vector preparation, administered at a rate of  $0.2\ \mu\text{l min}^{-1}$ , injected stereotaxically into the dorsal subiculum of adult WT and KO mice at the following coordinates (mm) anteroposterior (AP), mediolateral (ML) and dorsoventral (DV) relative to Bregma AP/ML/DV:  $-3.3/1.55/-1.8$  and  $3.2/1.5/-1.65$ , respectively. After 2 weeks, brains were removed after intracardial perfusion of 4% PFA, sliced at  $30\ \mu\text{m}$  using vibratome (Leica, VT1000S) and mounted on Superfrost plus slides (Menzel-Gläser). Sagittal sections were stained with Nissl Neurotrace stain (Life Technologies) and observed with a confocal microscope (Zeiss, LSM 710).

**Plasmids and expression of recombinant proteins.** MAP6-E corresponds to amino acids (aa) 1–614 of NP\_058900. EGFP-tagged MAP6-E constructs were fused to a C-terminal EGFP, using plasmid pEGFP-N1 (Clontech), with the following modifications:  $\Delta\text{Mn}$  = deletion of aa 124–138 + aa 161–171 + aa 527–541;  $\Delta\text{Mc}$  = deletion of aa 226–451;  $\Delta\text{PRD39-57}$  = deletion of aa 39–57;  $\Delta\text{Mn3}$  = deletion of aa 527–541. LNT refers to aa 1–225. GST-LNT refers to LNT fused to a N-terminal GST, using plasmid pGEX-6P-1 (GE Life Sciences). GST-tagged intersectin-SH3 A-E constructs were kindly provided by Peter McPherson (McGill University, Canada). GST-tagged cSrc-SH3 (aa 81–142, rat sequence) was subcloned to pGEX-4T-1. GST-tagged p85-SH3 (aa 1–79, mouse sequence) was subcloned into a pGEX-2T vector. GST-tagged PLC $\gamma$ -SH3 (aa 790–852, rat sequence) was subcloned into pGEX-6P-1. GST constructs were transformed into *Escherichia coli* strain JM109 by heat shock and the expressed recombinant proteins were bound to glutathione (GSH)-sepharose beads according to the manufacturer's instructions (GE Healthcare).

**Electron microscopy.** Mice were fixed by perfusion and fornix as well as corpus callosum were dissected before being quickly immersed in fixative (2% PFA and 2% glutaraldehyde in 0.1 M cacodylate buffer). Samples were then post-fixed with 1% osmium tetroxide, stained in 1% uranyl acetate and dehydrated in ethanol before being embedded in epoxy resin (Fluka). Ultrathin sections of the sample (60 nm) were stained with uranyl acetate and lead citrate before being viewed under a transmission electron microscope at  $80\ \text{kV}$  (JEOL 1200EX). Images were taken with a digital camera (Veleta, Olympus) and morphometric measurements were done with iTEM software (Soft Imaging System).

**Production and binding of Sema3E-AP, *in situ* hybridization.** HEK293T cells were transfected with the Sema3E-AP vector or empty pA-tag-5 vector as control, using a calcium phosphate kit (LifeTechnologies). After 3 days of culture in

Opti-MEM serum-free medium (Gibco), the supernatant was collected and concentrated using Centricon filters (Millipore). AP activity was measured using SIGMAFAST™ p-nitrophenyl phosphate tablets (Sigma Aldrich), as per the manufacturer's instructions. Sema3E-AP binding experiments on tissue sections and *in situ* hybridization were performed on 20 mm cryostat sections from WT and MAP6 KO E17.5 embryos<sup>36</sup>. PlexinD1 probe was generously provided by Mark Tessier-Lavigne.

**Neuron analysis.** Brains from WT and KO MAP6 littermate embryos (E17.5–18.5) were dissected to the ventrolateral cortex and the subiculum. Tissue pieces were dissociated and plated onto polylysine/laminin-coated four-well plates (Nunc) in Neurobasal medium supplemented with 1 mM glutamine, 1:50 B27 (GIBCO), and control AP or Sema3E-AP supernatants. In some experiments, neurons were electroporated with a GFP-pCAGGS vector alone or together with MAP6-E cDNA or different siRNAs (100 pmol). Efficient knockdown of MAP6 was obtained using Stealth RNAi (Invitrogen), siRNA1 sequence 5'-GCG AGU ACA GUA AGC AGC UCU UAC A-3' (siRNA1) and 5'-CCA AUA AGC CCA GUG CAG CGG ACA A-3' (siRNA2). In some experiments, neurons were electroporated with control GFP and GFP-MAP6-E full-length or GFP-MAP6 deletion mutants. After 24 h *in vitro*, cultured cells were fixed and immunostained with an anti-tubulin antibody<sup>67</sup> and labelled with Texas Red-X Phalloidin (1:1,000, Invitrogen). Quantification of axonal growth on cortical and subicular neurons in the presence or in the absence of Sema3E was performed by morphometric measures obtained using ImageJ software. Rescue experiments were obtained after transfection of MAP6 constructs in subicular neurons at plating using Amara transfections. Quantification of receptors and signalling protein expression was performed using anti-Neuropilin, goat anti Plexin D1, goat anti-VEGFR2 (R&D Systems) and anti-phosphoY1175-VEGFR2, anti-phosphoS473-Akt (Cell Signaling Technology).

**Co-culture experiments.** To produce aggregates of Sema3E-expressing cells, HEK293T cells were trypsinized 4–6 h after transfection with the AP-Sema3E vector and resuspended in 0.2 ml of culture medium (DMEM-GlutaMAX (Gibco), heat-inactivated fetal bovine serum (1:10), 1 mM Sodium pyruvate,  $100\ \text{U ml}^{-1}$  Penicillin-streptomycin) per 60-mm well. Drops of the cell suspension were placed onto the lids of 35 mm dishes, which were inverted and incubated over culture medium for 16 h. Clusters of AP-Sema3E-expressing HEK293T cells were placed on glass coverslips together with explants of subiculum from E17.5 WT or MAP6-KO mouse embryos, and embedded in 15  $\mu\text{l}$  of chicken plasma (Sigma) coagulated with 15  $\mu\text{l}$  of thrombin ( $0.2\ \text{mg ml}^{-1}$ , 20 NIHU  $\text{ml}^{-1}$  Sigma). The co-cultures were incubated in neurobasal medium supplemented with 1 mM glutamine, B27 (GIBCO) (1:50) for 2 days at  $37^{\circ}\text{C}$ , 5%  $\text{CO}_2$  in a humidified incubator. After fixation in 4% PFA, axons were immunostained with mouse anti-tubulin antibody (Sigma T9026, 1:1,000) and donkey anti-mouse Alexa Fluor 568 secondary antibody (Life Technologies A10037, 1:500). The guidance effect was quantified by calculating the P/D Ratio, where P and D represent the length of axons extending in the quadrants proximal and distal to the HEK 293T cell aggregate, respectively. Therefore, a P/D ratio of 1 indicates no bias towards or away from the source of Sema3E.

**Biochemical experiments.** For Immunoprecipitation experiments, HEK-293 T17 (ATCC) cells were transfected with VEGFR2 and/or PlexinD1 and/or Neuropilin1<sup>35</sup> and/or MAP6-E-GFP cDNAs using a calcium phosphate kit (LifeTechnologies). One day after transfection, cells were scraped with lysis buffer (20 mM Tris, 1 mM EGTA, 1 mM EDTA, 5 mM NaF, 1 mM DTT, 0.27 M sucrose, 0.5% Triton X-100, pH 7.2) in the presence of protease inhibitors (Complete Cocktail tablets, Roche). After centrifugation of the cell lysate at  $12,000\ \text{g}$  for 20 min at  $4^{\circ}\text{C}$ , the supernatant was diluted  $3\times$  with buffer C (2% glycerol, 10 mM Tris-HCL pH 7.5) and incubated for 4 h at RT with 20  $\mu\text{g}$  Rabbit anti-MAP6 23N<sup>25</sup> or 10  $\mu\text{g}$  Goat anti PlexinD1 (R&D Systems) or 10  $\mu\text{g}$  Goat anti Neuropilin (R&D Systems) or 10  $\mu\text{l}$  Rabbit anti VEGFR2 (Cell Signaling). Complexes were precipitated by 35  $\mu\text{l}$  Dynabeads Protein G- (Life Technologies) for 40 min at RT. The immunoprecipitates were washed successively with buffer A (0.2% NP-40, 150 mM NaCl, 2 mM EDTA, 2% glycerol, 10 mM Tris-HCL pH 7.5) buffer B (0.2% NP-40, 500 mM NaCl, 2 mM EDTA, 2% glycerol, 10 mM Tris-HCL pH 7.5) and buffer C. Complexes were separated by electrophoresis, blotted and revealed using the following antibodies: Rabbit anti-VEGFR2 (1/4,000, Cell Signaling), goat anti-PlexinD1 (1/1,000, R&D Systems), goat anti-Neuropilin (1/1,000, R&D Systems), rabbit anti-GFP (1/1,000 Life Technologies). Similar immunoprecipitates protocol was performed using subicular neurons grown for 3 days *in vitro* and using 23N rabbit polyclonal antibody against MAP6<sup>68</sup>. For pull-down experiments, brain lysates were incubated with the GSH-sepharose beads (GE Healthcare) coated with GST recombinant proteins and bound proteins analysed by western blot.

**Statistical analysis.** Statistics were performed using the Prism 5.0 software (GraphPad Software) using tests as indicated in each figure.



## References

- De Peri, L. *et al.* Brain structural abnormalities at the onset of schizophrenia and bipolar disorder: a meta-analysis of controlled magnetic resonance imaging studies. *Curr. Pharm. Des.* **18**, 486–494 (2012).
- Shepherd, A. M., Laurens, K. R., Matheson, S. L., Carr, V. J. & Green, M. J. Systematic meta-review and quality assessment of the structural brain alterations in schizophrenia. *Neurosci. Biobehav. Rev.* **36**, 1342–1356 (2012).
- Fitzsimmons, J., Kubicki, M. & Shenton, M. E. Review of functional and anatomical brain connectivity findings in schizophrenia. *Curr. Opin. Psychiatry* **26**, 172–187 (2013).
- McIntosh, A. M., Hall, J., Lymer, G. K., Sussmann, J. E. & Lawrie, S. M. Genetic risk for white matter abnormalities in bipolar disorder. *Int. Rev. Psychiatry* **21**, 387–393 (2009).
- Kanaan, R. A. *et al.* Diffusion tensor imaging in schizophrenia. *Biol. Psychiatry* **58**, 921–929 (2005).
- Hazlett, E. A., Goldstein, K. E. & Kolaitis, J. C. A review of structural MRI and diffusion tensor imaging in schizotypal personality disorder. *Curr. Psychiatry Rep.* **14**, 70–78 (2012).
- Poullain, F. E. & Sobel, A. The microtubule network and neuronal morphogenesis: Dynamic and coordinated orchestration through multiple players. *Mol. Cell Neurosci.* **43**, 15–32 (2010).
- Jaworski, J. *et al.* Dynamic microtubules regulate dendritic spine morphology and synaptic plasticity. *Neuron* **61**, 85–100 (2009).
- Bahi-Buisson, N. *et al.* New insights into genotype-phenotype correlations for the doublecortin-related lissencephaly spectrum. *Brain* **136**, 223–244 (2013).
- Bradshaw, N. J. & Porteous, D. J. DISC1-binding proteins in neural development, signalling and schizophrenia. *Neuropharmacology* **62**, 1230–1241 (2012).
- Kuijpers, M. & Hoogenraad, C. C. Centrosomes, microtubules and neuronal development. *Mol. Cell Neurosci.* **48**, 349–358 (2011).
- Cleveland, D. W., Hwo, S. Y. & Kirschner, M. W. Purification of tau, a microtubule-associated protein that induces assembly of microtubules from purified tubulin. *J. Mol. Biol.* **116**, 207–225 (1977).
- Goedert, M., Crowther, R. A. & Garner, C. C. Molecular characterization of microtubule-associated proteins tau and MAP2. *Trends Neurosci.* **14**, 193–199 (1991).
- Takemura, R. *et al.* Increased microtubule stability and alpha tubulin acetylation in cells transfected with microtubule-associated proteins MAP1B, MAP2 or tau. *J. Cell Sci.* **103**(Pt 4): 953–964 (1992).
- Margolis, R. L., Rauch, C. T. & Job, D. Purification and assay of a 145-kDa protein (STOP145) with microtubule-stabilizing and motility behavior. *Proc. Natl Acad. Sci. USA* **83**, 639–643 (1986).
- Guillaud, L. *et al.* STOP proteins are responsible for the high degree of microtubule stabilization observed in neuronal cells. *J. Cell Biol.* **142**, 167–179 (1998).
- Caceres, A., Mautino, J. & Kosik, K. S. Suppression of MAP2 in cultured cerebellar macroneurons inhibits minor neurite formation. *Neuron* **9**, 607–618 (1992).
- Brugg, B., Reddy, D. & Matus, A. Attenuation of microtubule-associated protein 1B expression by antisense oligodeoxynucleotides inhibits initiation of neurite outgrowth. *Neuroscience* **52**, 489–496 (1993).
- Hanemaaijer, R. & Ginzburg, I. Involvement of mature tau isoforms in the stabilization of neurites in PC12 cells. *J. Neurosci. Res.* **30**, 163–171 (1991).
- Harada, A. *et al.* Altered microtubule organization in small-calibre axons of mice lacking tau protein. *Nature* **369**, 488–491 (1994).
- Ke, Y. D. *et al.* Lessons from tau-deficient mice. *Int. J. Alzheimer's Dis.* **2012**, 873270 (2012).
- Takei, Y. *et al.* Delayed development of nervous system in mice homozygous for disrupted microtubule-associated protein 1B (MAP1B) gene. *J. Cell Biol.* **137**, 1615–1626 (1997).
- Andrieux, A. *et al.* The suppression of brain cold-stable microtubules in mice induces synaptic defects associated with neuroleptic-sensitive behavioral disorders. *Genes Dev.* **16**, 2350–2364 (2002).
- Job, D., Fischer, E. H. & Margolis, R. L. Rapid disassembly of cold-stable microtubules by calmodulin. *Proc. Natl Acad. Sci. USA* **78**, 4679–4682 (1981).
- Bosc, C. *et al.* Cloning, expression, and properties of the microtubule-stabilizing protein STOP. *Proc. Natl Acad. Sci. USA* **93**, 2125–2130 (1996).
- Richard, M. *et al.* STOP proteins contribute to the maturation of the olfactory system. *Mol. Cell Neurosci.* **41**, 120–134 (2009).
- Couegnas, A., Schweitzer, A., Andrieux, A., Ghandour, M. S. & Boehm, N. Expression pattern of stop lacZ reporter gene in adult and developing mouse brain. *J. Neurosci. Res.* **85**, 1515–1527 (2007).
- Fournet, V. *et al.* The deletion of the microtubule-associated STOP protein affects the serotonergic mouse brain network. *J. Neurochem.* **115**, 1579–1594 (2010).
- Bouvrais-Veret, C. *et al.* Microtubule-associated STOP protein deletion triggers restricted changes in dopaminergic neurotransmission. *J. Neurochem.* **104**, 745–756 (2008).
- Brun, P. *et al.* Dopaminergic transmission in STOP null mice. *J. Neurochem.* **94**, 63–73 (2005).
- Delotterie, D. *et al.* Chronic administration of atypical antipsychotics improves behavioral and synaptic defects of STOP null mice. *Psychopharmacology* **208**, 131–141 (2010).
- Begou, M. *et al.* The stop null mice model for schizophrenia displays cognitive and social deficits partly alleviated by neuroleptics. *Neuroscience* **157**, 29–39 (2008).
- Benardais, K. *et al.* Loss of STOP protein impairs peripheral olfactory neurogenesis. *PLoS ONE* **5**, e12753 (2010).
- Powell, K. J. *et al.* Cognitive impairments in the STOP null mouse model of schizophrenia. *Behav. Neurosci.* **121**, 826–835 (2007).
- Bellon, A. *et al.* VEGFR2 (KDR/Flk1) signaling mediates axon growth in response to semaphorin 3E in the developing brain. *Neuron* **66**, 205–219 (2010).
- Chauvet, S. *et al.* Gating of Sema3E/PlexinD1 signaling by neuropilin-1 switches axonal repulsion to attraction during brain development. *Neuron* **56**, 807–822 (2007).
- Kishi, T. *et al.* Topographical organization of projections from the subiculum to the hypothalamus in the rat. *J. Comp. Neurol.* **419**, 205–222 (2000).
- Feng, G. *et al.* Imaging neuronal subsets in transgenic mice expressing multiple spectral variants of GFP. *Neuron* **28**, 41–51 (2000).
- Porrero, C., Rubio-Garrido, P., Avendano, C. & Clasca, F. Mapping of fluorescent protein-expressing neurons and axon pathways in adult and developing Thy1-eYFP-H transgenic mice. *Brain Res.* **1345**, 59–72 (2010).
- Olsson, A. K., Dimberg, A., Kreuger, J. & Claesson-Welsh, L. VEGF receptor signalling - in control of vascular function. *Nat. Rev. Mol. Cell Biol.* **7**, 359–371 (2006).
- Koch, S., Tugues, S., Li, X., Gualandi, L. & Claesson-Welsh, L. Signal transduction by vascular endothelial growth factor receptors. *Biochem. J.* **437**, 169–183 (2011).
- Morderer, D. *et al.* Endocytic adaptor protein intersectin 1 forms a complex with microtubule stabilizer STOP in neurons. *Gene* **505**, 360–364 (2012).
- Volle, J. *et al.* Reduced expression of STOP/MAP6 in mice leads to cognitive deficits. *Schizophr. Bull.* **39**, 969–978 (2013).
- Burgess, N. Spatial cognition and the brain. *Ann. N. Y. Acad. Sci.* **1124**, 77–97 (2008).
- Fitzsimmons, J. *et al.* Diffusion tractography of the fornix in schizophrenia. *Schizophr. Res.* **107**, 39–46 (2009).
- Kendi, M. *et al.* Structural and diffusion tensor imaging of the fornix in childhood- and adolescent-onset schizophrenia. *J. Am. Acad. Child. Adolesc. Psychiatry.* **47**, 826–832 (2008).
- Lee, S. H. *et al.* Extensive white matter abnormalities in patients with first-episode schizophrenia: a Diffusion Tensor Imaging (DTI) study. *Schizophr. Res.* **143**, 231–238 (2013).
- Davidson, C. A. *et al.* An MRI study of septi pellucidi in relation to hippocampus volume and fornix integrity in schizophrenia. *Schizophr. Res.* **134**, 165–170 (2012).
- Luck, D., Malla, A. K., Joobar, R. & Lepage, M. Disrupted integrity of the fornix in first-episode schizophrenia. *Schizophr. Res.* **119**, 61–64 (2010).
- Zhou, Y. *et al.* Altered resting-state functional connectivity and anatomical connectivity of hippocampus in schizophrenia. *Schizophr. Res.* **100**, 120–132 (2008).
- Takei, K. *et al.* Disrupted integrity of the fornix is associated with impaired memory organization in schizophrenia. *Schizophr. Res.* **103**, 52–61 (2008).
- Nestor, P. G. *et al.* Episodic memory and neuroimaging of hippocampus and fornix in chronic schizophrenia. *Psychiatry Res.* **155**, 21–28 (2007).
- Ishizuka, K. *et al.* DISC1-dependent switch from progenitor proliferation to migration in the developing cortex. *Nature* **473**, 92–96 (2011).
- Kvajo, M. *et al.* Altered axonal targeting and short-term plasticity in the hippocampus of Disc1 mutant mice. *Proc. Natl Acad. Sci. USA* **108**, E1349–E1358 (2011).
- Lutkenhoff, E. *et al.* Structural and functional neuroimaging phenotypes in dysbindin mutant mice. *NeuroImage* **62**, 120–129 (2012).
- Nickl-Jockschat, T. *et al.* The impact of a Dysbindin schizophrenia susceptibility variant on fiber tract integrity in healthy individuals: a TBSS-based diffusion tensor imaging study. *NeuroImage* **60**, 847–853 (2012).
- McIntosh, A. M. *et al.* The effects of a neuregulin 1 variant on white matter density and integrity. *Mol. Psychiatry* **13**, 1054–1059 (2008).
- Worzfeld, T. *et al.* Genetic dissection of plexin signaling in vivo. *Proc. Natl Acad. Sci. USA* **111**, 2194–2199 (2014).
- Lim, R. W. & Halpain, S. Regulated association of microtubule-associated protein 2 (MAP2) with Src and Grb2: evidence for MAP2 as a scaffolding protein. *J. Biol. Chem.* **275**, 20578–20587 (2000).
- Usardi, A. *et al.* Tyrosine phosphorylation of tau regulates its interactions with Fyn SH2 domains, but not SH3 domains, altering the cellular localization of tau. *FEBS J* **278**, 2927–2937 (2011).
- Reynolds, C. H. *et al.* Phosphorylation regulates tau interactions with Src homology 3 domains of phosphatidylinositol 3-kinase, phospholipase Cgamma1, Grb2, and Src family kinases. *J. Biol. Chem.* **283**, 18177–18186 (2008).



62. Kappeler, C. *et al.* Magnetic resonance imaging and histological studies of corpus callosal and hippocampal abnormalities linked to doublecortin deficiency. *J. Comp. Neurol.* **500**, 239–254 (2007).
63. Meixner, A. *et al.* MAP1B is required for axon guidance and is involved in the development of the central and peripheral nervous system. *J. Cell Biol.* **151**, 1169–1178 (2000).
64. Basser, P. J. & Pierpaoli, C. A simplified method to measure the diffusion tensor from seven MR images. *Magn. Reson. Med.* **39**, 928–934 (1998).
65. Paxinos, G. & Franklin, K. *The mouse brain in stereotaxic coordinates* (Academic Press, 2001).
66. Schmued, L. *et al.* Introducing Black-Gold II, a highly soluble gold phosphate complex with several unique advantages for the histochemical localization of myelin. *Brain Res.* **1229**, 210–217 (2008).
67. Peris, L. *et al.* Tubulin tyrosination is a major factor affecting the recruitment of CAP-Gly proteins at microtubule plus ends. *J. Cell Biol.* **174**, 839–849 (2006).
68. Galiano, M. R. *et al.* Astrocytes and oligodendrocytes express different STOP protein isoforms. *J. Neurosci. Res.* **78**, 329–337 (2004).

## Acknowledgements

We thank O. Sarraut, E. Billet-Hernández, S. Garbit, A. Schweitzer, S. Pierre and all zootechnicians for the animal care and production; M. Champeboux, N. Collomb, D. Divers for technical help, J. Delaroche for electron microscopy expertise and C. Delphin and D. Job for critical reading. We also thank the MRI facility IRMaGe and the electron microscopy facility of the Grenoble Institute of Neurosciences. A.D. and J.J. received stipends from the Région Rhone-Alpes – Cluster HVN-ARC2. This work was supported by INSERM, CEA, Univ. Grenoble Alpes and French National Research Agency Awards 2010Blan120201 CBioS (to A.A.) and grants from the National Health and Medical Research Council of Australia (P.J.R. and J.X.). The MRI facility IRMaGe is partly funded by the French program 'Investissement d'Avenir' run by the French National Research Agency, grant 'Infrastructure d'avenir en Biologie Sante' - ANR-11-INBS-0006.

## Author contributions

J.C.D. and A.A. conceived and designed the study. J.C.D. and S.G-F. performed the experiments, with contributions from J.X., J.J., B.B., M.J., S.C., E.M., C.M., A.D., A.D., C.B.; J.B. and E.D. performed statistical analysis and image processing respectively. N.D. provided GFP lenti-virus. I.V. and P.J.R. provided intellectual input regarding VEGFR2 and SH3 proteins. F.M. and S.C. provided intellectual input, expertise and tools for semaphorin study; E.B. supervised anatomical MRI with the help from O.M.; H. L. developed DTI techniques and supervised F.M.; K.P.G. performed electron microscopy analysis with the contribution from I.L.; J.C.D., P.J.R., F.M. and A.A. wrote the manuscript, with contribution from all co-authors.

## Additional information

**Supplementary Information** accompanies this paper at <http://www.nature.com/naturecommunications>

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

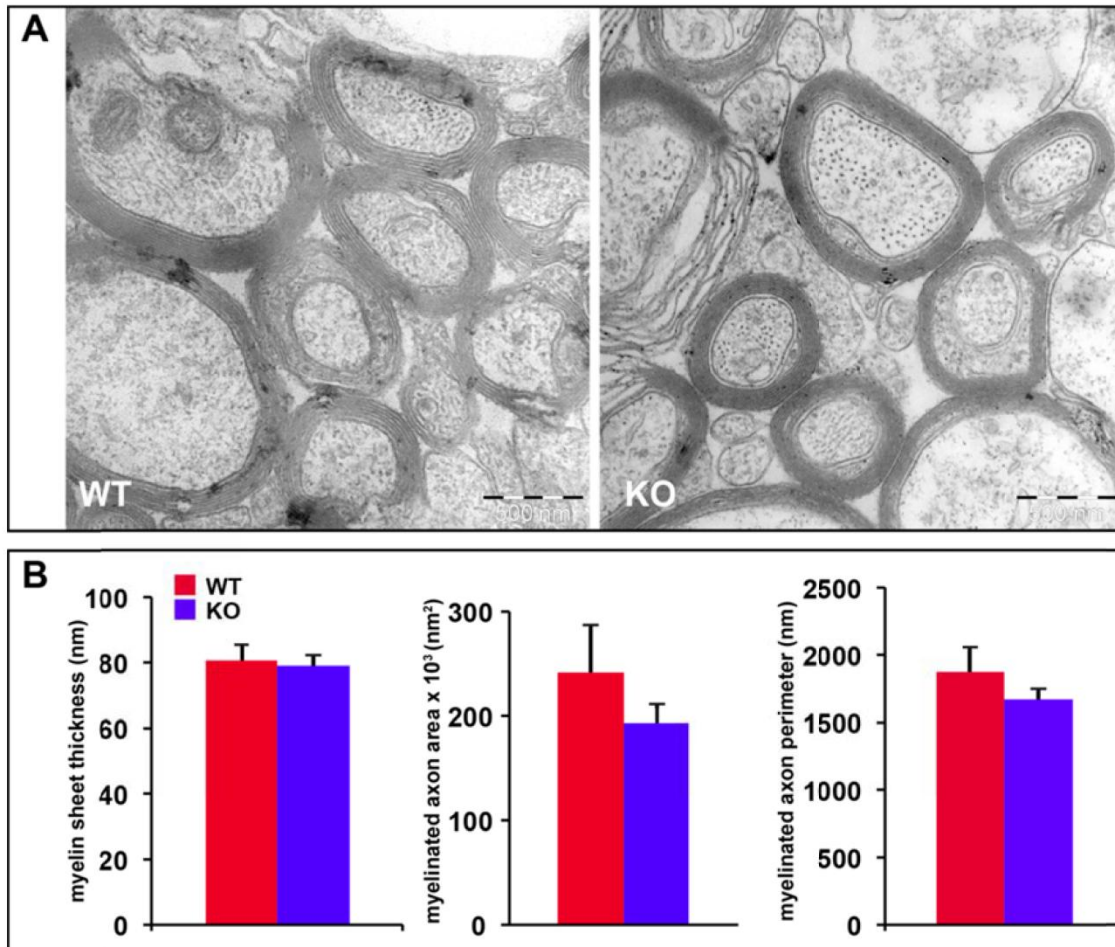
**Reprints and permission** information is available online at <http://npg.nature.com/reprintsandpermissions/>

**How to cite this article:** Deloulme, J. C. *et al.* Microtubule-associated protein 6 mediates neuronal connectivity through Semaphorin 3E-dependent signalling for axonal growth. *Nat. Commun.* **6**:7246 doi: 10.1038/ncomms8246 (2015).



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

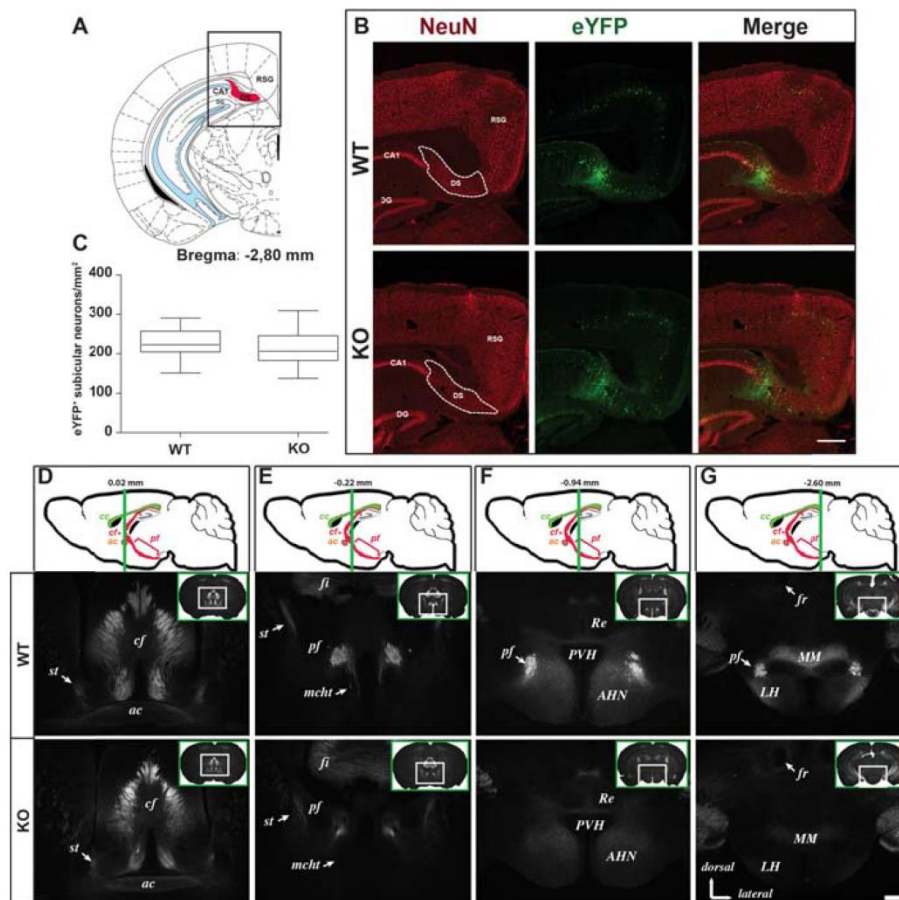
**Supplementary Figure 1. The integrity of myelin sheaths is not affected in MAP6 KO mice**



(A) Representative ultrastructural images of cross-sectioned axons within the corpus callosum from WT and KO mice.

(B) Quantifications of myelin sheath thickness, axon area and axon perimeter. Values are given as means  $\pm$  SEM for five animals per genotype ( $n \geq 40$  axons measured per animal). No significant statistical differences were found between WT and KO using the Student's t test. Scale bar: 500 nm.

**Supplementary Figure 2. MAP6 deletion results in the absence of the post-commissural fornix without obvious modification in subicular neuronal population**

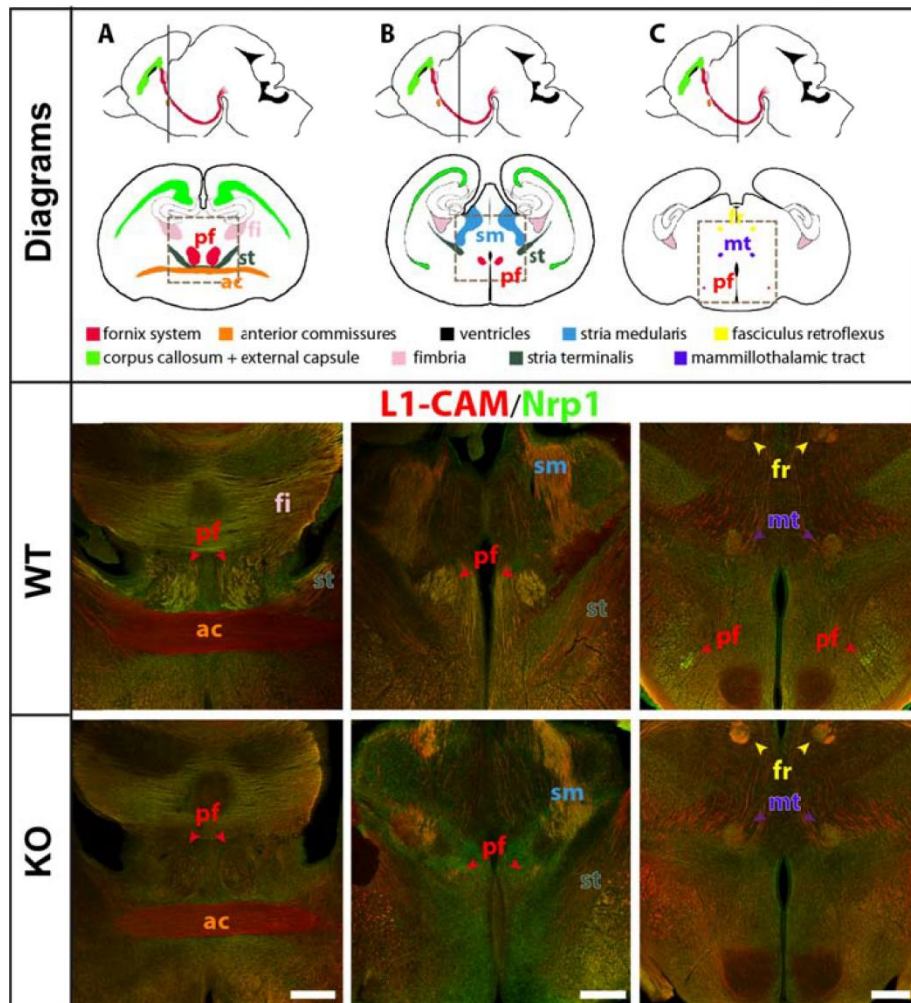


(A-C) Coronal sections of hippocampal formation from adult WT/Thy-eYFP-H and MAP6 KO/Thy-eYFP-H. The dorsal subiculum (DS) shown in the diagram of Bregma -2.80mm section (A) was delimited on NeuN immunolabeling slice (B, dashed ROI). The density of eYFP subicular neurons in WT and MAP6 KO dorsal subiculum was quantified and the results shown in (C). No significant difference was observed between genotype (n=5 animals for each genotype). Scale bar 400 $\mu$ m. (D-G) Fluorescence in WT/Thy-eYFP-H and MAP6 KO/ Thy-eYFP-H mice for 4 identical coronal sections. In the sagittal diagrams, the fornix and the post-commissural fornix are indicated in red. The green line indicates the coronal plane (Bregma value in mm). The position of microscopic field appears in insets. Scale bar 200 $\mu$ m.

Abbreviations: P, presubiculum; S, subiculum; DS, dorsal subiculum; cc, corpus callosum; DG, dentate gyrus; CA1, ammon's horn 1; cf, column of the fornix; pf, post-commissural fornix; ac, anterior commissure; st, stria terminalis; fi, fimbria; mcht, medial corticohypothalamic tract; Re, reuniens thalamic nucleus; PVH, paraventricular hypothalamic nucleus; AHN, anterior hypothalamic nucleus; fr, fasciculus retroflexus; MM, medial mammillary nucleus medial part; LH, lateral hypothalamic area.



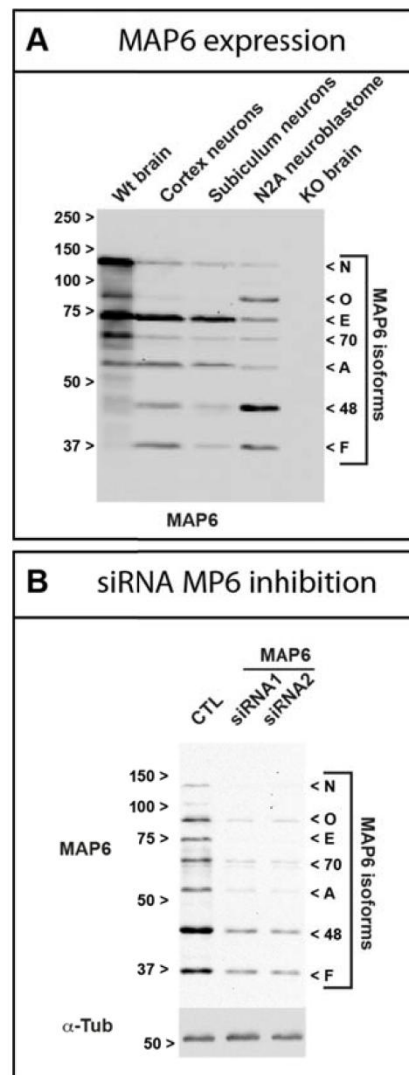
**Supplementary Figure 3: MAP6 is necessary for the development of the post-commissural fornix.**



(A-C) Coronal sections of E18.5 WT and MAP6 KO brain double-immunostained with anti L1 CAM and neuropilin1 (Nrp1). For each panel, a sagittal diagram shows the projection stack of post-commissural fornix in red and a grey line indicates the level of coronal section. The position of the major neuronal tracts was indicated on a coronal diagram and the dashed square indicates the position of microscopic field. The fornix is indicated in red. Scale bars, 300  $\mu$ m.

Abbreviations: cf, column of the fornix, pf, post-commissural fornix; .ac, anterior commissure; fi, fimbria; sm, stria medularis; st, stria terminalis; mt, mammillary tract; fr, fasciculus retroflexus.

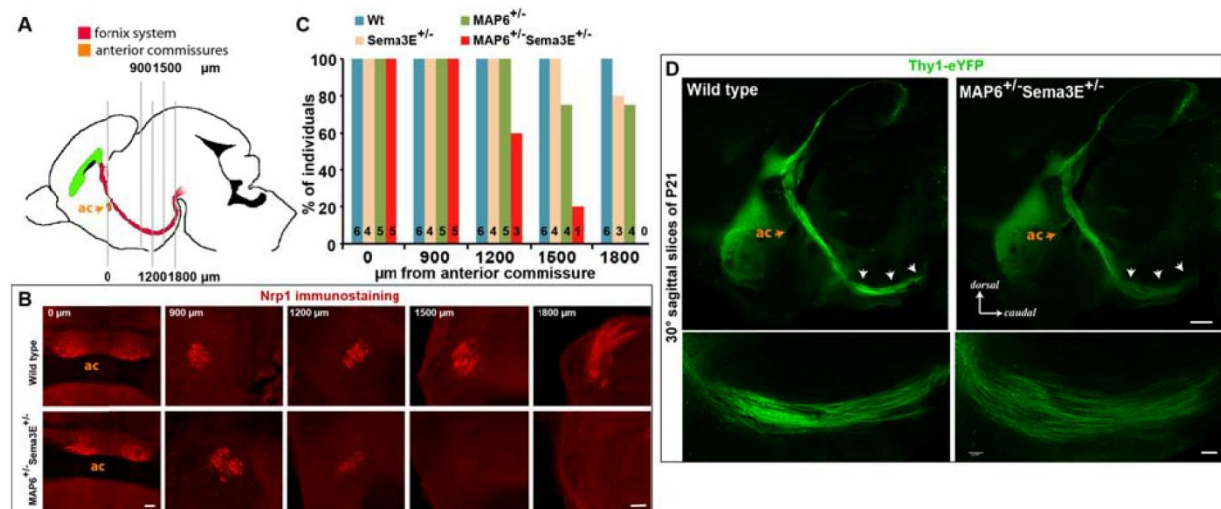
**Supplementary Figure 4. Expression of MAP6 proteins.**



(A) Western blot of total protein from mouse brain homogenate (WT brain and MAP6 KO brain), cell extracts from mouse neuroblastoma Neuro-2A (N2A) and *in vitro* cultured subicular and cortical neurons (3 days of culture), blotted with MAP6 23N antibody.

(B) Western blot of crude extracts of cultured N2A cells treated for 48 h with MAP6 siRNA1, MAP6 siRNA2 and negative control siRNA (CTL), blotted with MAP6 23N antibody and with  $\alpha$ -tubulin antibody ( $\alpha$ -Tub). Both siRNAs induce a strong reduction of MAP6-E expression.

## Supplementary Figure 5: MAP6 and Sema3E cooperate *in vivo* during fornix formation.



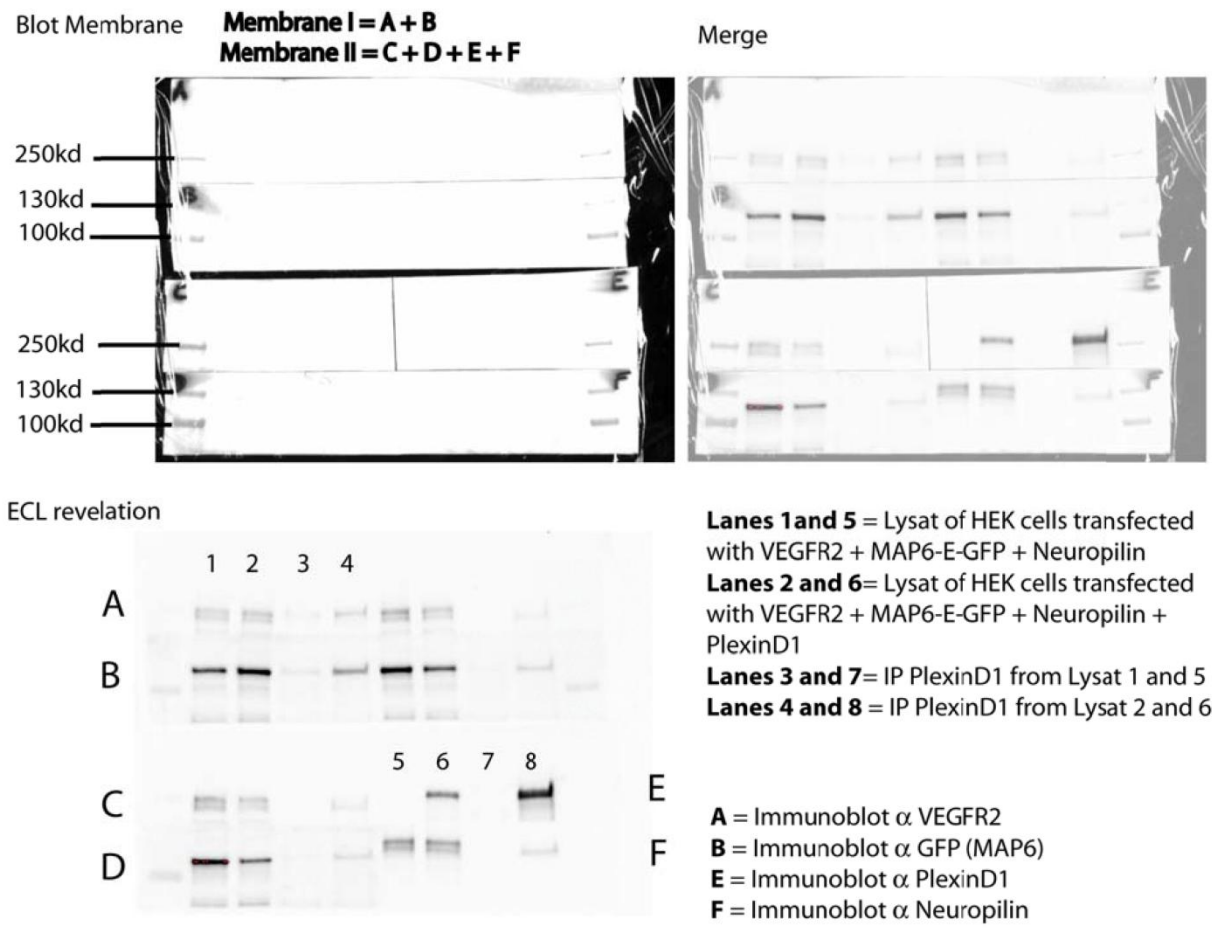
(A) Sagittal diagram showing the projection stack of post-commissural fornix in red. Grey lines indicate the level of coronal section through the fornix to the hypothalamus of P1 from WT, Sema3E heterozygous (Sema3E<sup>+/-</sup>), MAP heterozygous (MAP6<sup>+/-</sup>) and double Sema3E/MAP6 heterozygous (MAP6<sup>+/-</sup> Sema3E<sup>+/-</sup>) mice.

(B) Brains coronal sections after immunolabelling with anti Nrp1 antibody. As compared to WT, the formation of the fornix is strongly delayed in double heterozygous MAP6<sup>+/-</sup> Sema3E<sup>+/-</sup> animals. Scale bars, 100 μm.

(C) Quantifications of the caudal extension of the post-commissural fornix from the anterior commissure (0 μm) to the mammillary body (+1800 μm), for each genotype. In WT the fornix is visible in all sections (6/6 animals). In Sema3E<sup>+/-</sup>/MAP6<sup>+/-</sup> animals the fornix was visible at 900 μm from the anterior commissure in 5/5 animals but only in 1/5 animal at 1500 μm and in 0/5 animal at 1800 μm. A milder phenotype was observed for single heterozygous MAP6<sup>+/-</sup> and Sema3E<sup>+/-</sup> animals; the fornix was visible on 3/4 and 4/5 at +1800 μm.

(D) Analysis of the fornix using WT/Thy1-eYFP-H and MAP6<sup>+/-</sup>/Sema3E<sup>+/-</sup>/Thy1-eYFP-H P21 mice in sagittal slices with a cutting angle of 30°. In double heterozygous MAP6<sup>+/-</sup> Sema3E<sup>+/-</sup> brains, the fornix is strongly defasciculated in the terminal part of the post-commissural fornix (arrows). Scale bars, 500 μm.

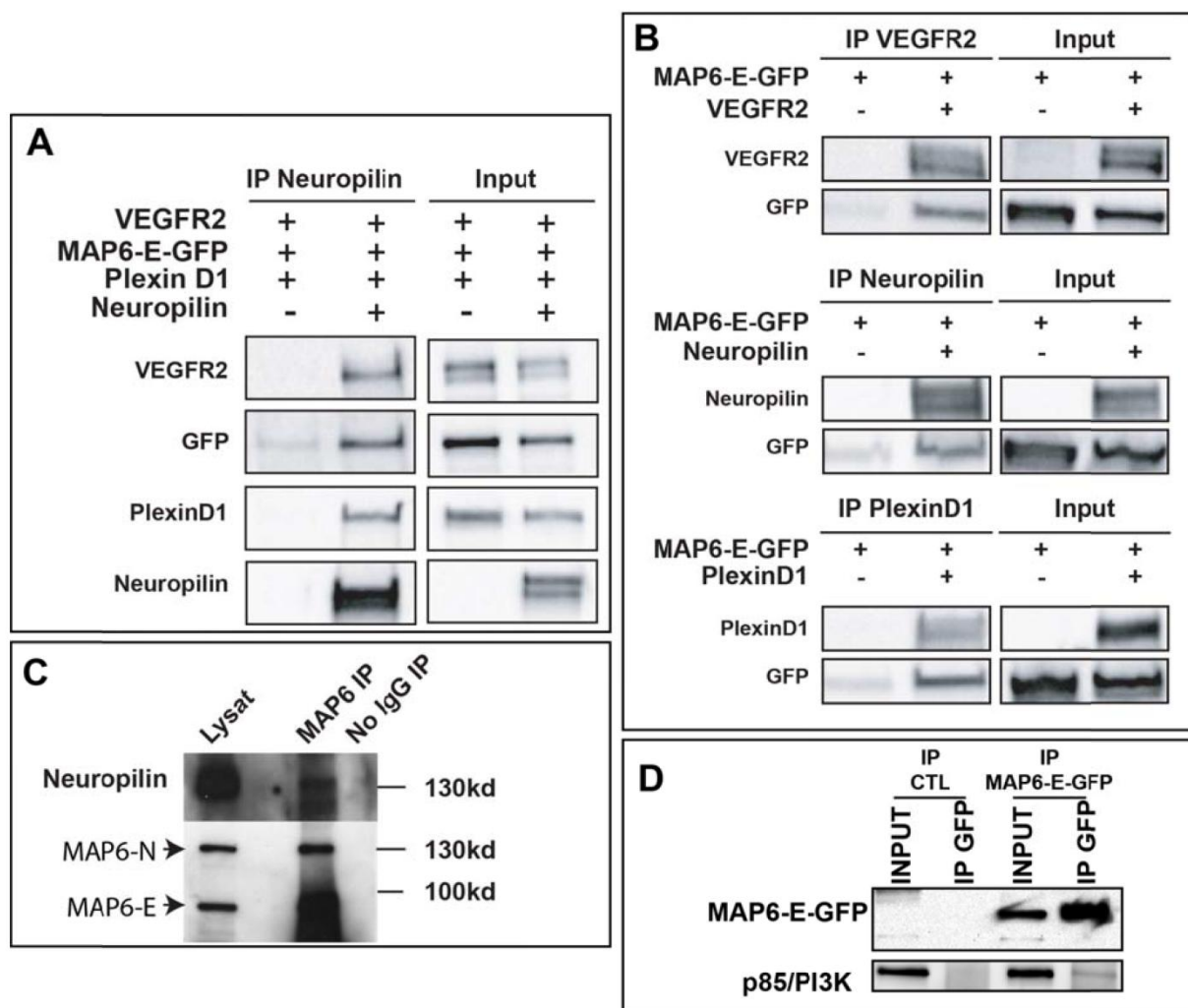
**Supplementary Figure 6: Full blots from main Figure 7A**



Bands from ECL revelation in numbered lanes correspond to Figure 7A



**Supplementary Figure 7: MAP6 interacts with Sema3E tripartite receptor components and p85/PI3 kinase**



(A) HEK 293T17 cells were transfected with MAP6–E-GFP, VEGFR2, Plexin D1 and Neuropilin1 cDNAs. Immunoprecipitation was performed using polyclonal anti-Nrp1 antibody. PlxD1, VEGFR2 and MAP6 were found co-immunoprecipitated with Nrp1. In control experiments, Nrp1 cDNA was omitted.

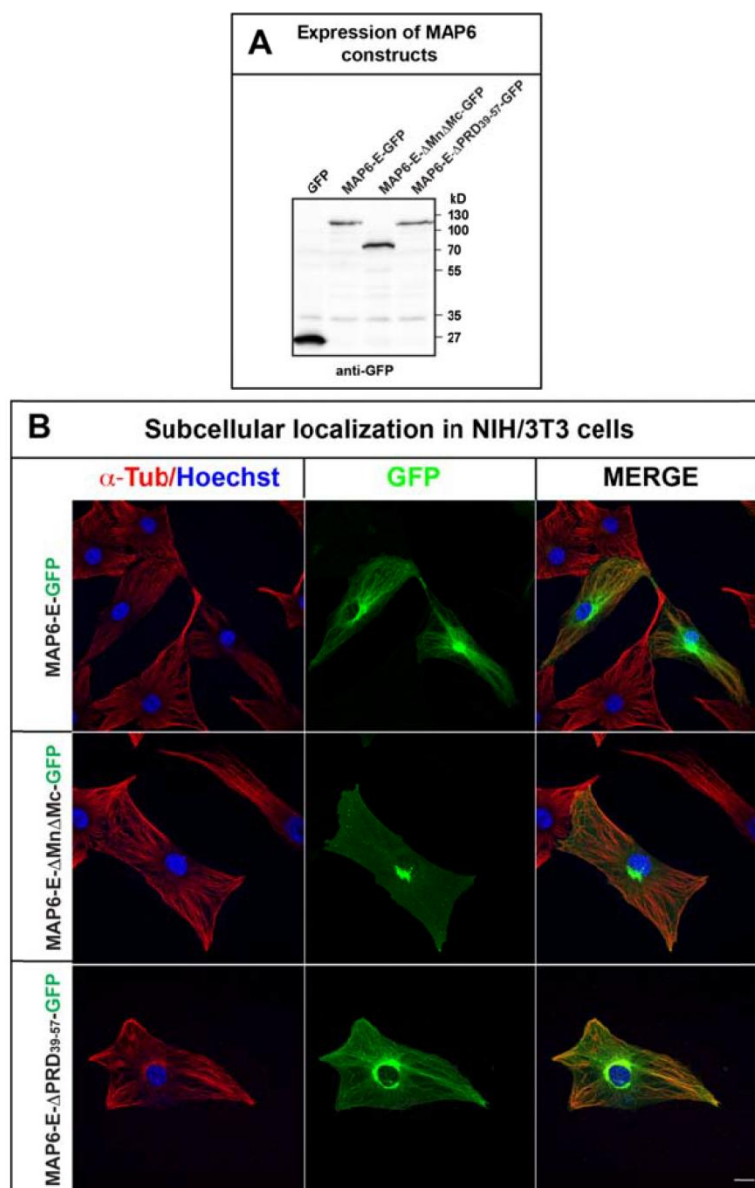
(B) Immunoprecipitation of MAP6-E-GFP and Sema3E receptor proteins. HEK 293T17 cells were transfected with MAP6–E-GFP and either VEGFR2, PlexinD1 or Neuropilin1 cDNAs. MAP6 co-immunoprecipitated individually with PlxD1, VEGFR2 and Nrp1.

(C) Immunoprecipitation of endogenous MAP6-E and –N from subicular neurons using anti-MAP6 23N antibody. Endogenous Nrp1 was found immunoprecipitated with MAP6 proteins.

(D) HEK 293T17 cells were transfected with MAP6–E-GFP and immunoprecipitated using anti GFP antibody. Endogenous p85/PI3K was found in the immunoprecipitated.



**Supplementary Figure 8: Subcellular localization of MAP6-E-GFP constructs in NIH-3T3 cells**



(A) Western blot analysis showing the expression of MAP6 constructs after transfection in subicular neurons.

(B) Subcellular localization of MAP6-E (upper panel), MAP6-E- $\Delta$ Mn $\Delta$ Mc (middle panel) and MAP6-E- $\Delta$  PRD<sub>39-42</sub> fused with GFP in transfected NIH-3T3 cells. Cells were transfected using Lipofectamine 2000, fixed 18 h after transfection for 25 min with PFS (4% paraformaldehyde, 4% sucrose), permeabilized 3 min with PBS 0.2% Triton X-100, incubated with an anti tubulin antibody for 45 min in PBS-Tween 0.2% and with secondary antibodies for 40 min. Cells were analyzed with a confocal microscope LSM 710 (Zeiss). The deletion of Mc and Mn microtubule binding domains of MAP6-E suppress it association with the microtubular network to favor Golgi and membrane localization.

#### 10.4 **Résumé de l'article "Characterization of CRMP4 as a partner of the MAP6 protein in the semaphorin-3E signaling pathway."**

par **Boulan B.**, Ravello C., Bosc C., Delphin C., Denarier E., Valiron O., Kraut A., Fournier A., Andrieux A., Gory-Fauré S., et Deloulme J.C.

En soumission prochainement.

Dans cette étude nous nous sommes intéressés à l'identification de partenaires protéiques interagissant avec MAP6 au niveau cérébral dans le but de déterminer de possibles acteurs de la signalisation induite par la Sema3E. Cette molécule de guidage axonale est impliquée, avec MAP6, dans la formation des projections axonales des neurones du subiculum, le fornix. En effet, le traitement avec de la Sema3E de neurones du subiculum en culture stimule leur croissance axonale. De plus l'inhibition de cette signalisation conduit à des altérations du fornix *in vivo*.

A partir d'élutions de lysat de cerveaux sur colonne d'affinité couplée à des anticorps dirigés contre MAP6, nous avons pu identifier les membres 1, 2 et 4 de la famille des Collapsin Response Mediator Protein (CRMP) en spectrométrie de masse (Figure 1-A). Ces protéines nous ont particulièrement intéressé car elle avaient déjà été caractérisées pour leur implication dans des signalisations dépendantes de la Sema3A (Goshima et al., 1995; Uchida et al., 2005; Yamashita et al., 2007; Niisato et al., 2011). Les CRMP étant, tout comme MAP6, capable d'interagir avec les cytosquelettes d'actine et de microtubule nous avons montré par des expériences de pulldown qu'une interaction directe entre les CRMP1, 2 ou 4 et les isoformes neuronales (N et E) de MAP6 est possible (Figure 1-C).

Dans un second temps, nous avons testé l'effet de l'inhibition de l'expression des différentes CRMP interagissant avec MAP6 sur la stimulation de la croissance axonale des neurones du subiculum induite par la Sema3E. L'inhibition de l'expression des CRMP par électroporation de siRNA dans des cultures de neurones, nous a permis de montrer que seule CRMP4 est nécessaire à cette signalisation (Figure 2-A,B,C). Nous avons reproduit ces résultats à partir de cultures de neurones KO CRMP4 (Figure 2-E) montrant ainsi l'absence de compensation de la suppression de cette protéine dans notre système. C'est pourquoi nous nous sommes focalisé sur cette protéine pour l'étude des conséquences neuro-anatomiques du KO CRMP4.

Nous avons tout d'abord vérifié que CRMP4 est exprimée, *in vivo* (Figure 3-B, C) et *in vitro* (Figure 3-D), aussi bien au niveau des corps cellulaires que des projections axonales des neurones du subiculum.

En accord avec son implication dans la signalisation attractive Sema3E dépendante, un défaut de formation du fornix a été observé chez les souris KO CRMP4. En effet l'analyse histologique du fornix a permis de montrer un retard de croissance à P0 (Figure 4-A, B). Retard, qui a ensuite été confirmé par l'étude plus fine de ce faisceau entre le jour embryonnaire E18.5 et le jour post-natal P2. Pour cela nous avons mis au point des techniques de transparisation des cerveaux nous permettant de montrer à la fois des altérations de la taille, du volume et de la fasciculation du fornix quelque soit son stade développemental (Figure 4-C). Ce retard de croissance a pour conséquence une diminution de la surface de fibre post-commissurale du fornix à l'âge adulte (Figure 4-B). Les techniques de transparisation ont alors permis la détection de conséquences plus subtiles de l'absence de CRMP4. Ainsi, des perturbations de l'émergence d'une branche du fornix nommée faisceau cortico-hypothalamique médial (mcht) ont pu être révélées (Figure 4-A).

Pour finir, nous nous sommes intéressés aux interactions génétiques possibles entre MAP6, CRMP4 et la Sema3E. Nous avons donc croisé différentes lignées de souris mutées pour l'expression de chacune de ces protéines. Le retard de croissance du fornix est aggravé chez les souris doubles hétérozygotes pour les gènes *Map6* et *Crmp4* comparé aux simple hétérozygotes (Figure 6-A, B). En revanche, cette aggravation n'a pu être montrée que chez les souris doubles KO CRMP4 et Sema3E en comparaison des simples KO (Figure 6-A, B). La spécificité d'action de ces différents acteurs de la croissance du fornix a été contrôlée par l'analyse simultanée du faisceau mamillaire dont le diamètre n'est pas affecté quelque soit le génotype testé (Figure 4-B, 5-C et 6-C).

Cette publication qui sera soumise prochainement, constitue la majeure partie de mes travaux de thèse. En conséquence j'ai contribué à cet article tout d'abord pour la réalisation de l'ensemble des expériences (excepté l'analyse des partenaires de MAP6 en spectrométrie de masse), puis à travers sa rédaction.

## 10.5 **Article 2 : "Characterization of CRMP4 as a partner of the MAP6 protein in the semaphorin-3E signaling pathway."**

**Characterization of CRMP4 as a partner of the MAP6 protein in the semaphorin-3E signaling pathway during brain wiring**

Benoit Boulan<sup>1</sup>, Charlotte Ravello<sup>1</sup>, Christophe Bosc<sup>1</sup>, Christian Delphin<sup>1</sup>, Eric Denarier<sup>2</sup>, Odile Valiron<sup>1</sup>, Alexandra Kraut<sup>3</sup>, Alison E. Fournier<sup>4</sup>, Annie Andrieux<sup>2</sup>, Sylvie Gory-Fauré<sup>1</sup> and Jean Christophe Deloulme<sup>1</sup>

<sup>1</sup> Univ. Grenoble Alpes, Inserm 1216, 38000 Grenoble, France

<sup>2</sup> Univ. Grenoble Alpes, Inserm U1216 GIN, CEA BIG-GPC, 38000 Grenoble, France

<sup>3</sup> Univ. Grenoble Alpes, CNRS FR3425 , CEA BIG-BGE, 38000 Grenoble, France

<sup>4</sup> Department of Neurology and Neurosurgery, Montréal Neurological Institute, McGill University, Montréal, Québec H3A 2B4, Canada.

**Acknowledgments**

The authors are grateful for technical support from the Photonic Microscopy Facility, Grenoble (PIC-GIN). We also thank S. Andrieu, M. Lapierre, F. Mehr, L. Romian and F. Rimet for animal care, and C. Corrao and F. Vossier for mouse genotyping.

## **ABSTRACT**

During neurogenesis, axonal path finding play a central role on proper brain wiring. The outgrowth of axons is tightly regulated by multiple attractive, repulsive or bi-functional guidance cues. Semaphorin 3E (Sema3E) is one of the guidance cues implicated in the fornix formation by stimulating the axonal outgrowth of subicular neurons that project to hypothalamic structures. Within the growth cone, various intracellular effectors transduce Sema 3E guidance signals from the plasma membrane to the cytoskeleton to induce its remodelling. If most of the guidance cues effectors are known, their selectivity for a specific cue remain elusive. In this study, we took advantage of a recently identified crucial participation of MAP6 protein in Sema3E growth promoting activity and in fornix formation to identify new specific effectors involved in Sema3E signalling. We identified CRMPs proteins and more precisely three family members (CRMP1, 2 and 4) as MAP6 partners and demonstrated the specific involvement of CRMP4 in Sema3E growth promoting activity and fornix formation. We further established cooperative functions of MAP6, Sema3E and CRMP4 in the establishment of fornix tract.

Altogether this work reveal the crucial role of CRMP4 in combination with MAP6 to integrate Sema 3E cues in order to promote normal wiring of subicular neurons and normal hippocampal - hypothalamus connectivity.

## INTRODUCTION

Axonal path finding and outgrowth is tightly regulated during neurodevelopment of central nervous system (CNS). This allows the proper establishment of neuronal tracts that underlies basic and more evolved function of the CNS during life. The axonal growth and guidance involve many signaling pathways initiated by guidance cues such as semaphorins (He and Tessier-Lavigne, 1997), netrin (Tessier-Lavigne et al., 1988) or ephrin (Feldheim1 and O'Leary, 2010). These signalizations are transduced by receptors to intracellular effectors and finally regulate cytoskeleton dynamics at the basis of growth cone steering decisions (Dent et al., 2011; Omotade et al., 2016). Any deregulation of these function can leads to cognitive or psychiatric disorders such as schizophrenia and bipolar disorders (De Peri et al., 2012; Hazlett et al., 2012; McIntosh et al., 2009).

Belonging to the fornix system, the post-commissure of the fornix is the major output of the hippocampal formation. This neuronal tract is mainly composed from axons of the subicular neurons and ends mostly in the mammillary bodies (Witter, 2006). The post-commissural fornix belongs to a set of limbic connections, including the Papez circuit, involved in memory, emotion, personality and navigation (Bubb et al., 2017). Disruption of fornix or subicular neurons can lead to spatial memory deficits (Fletcher, 2006; Morris et al., 1990), to stress (Herman and Mueller, 2006) or loss of motivation (Andrzejewski et al., 2006). Furthermore, alteration of fornix has been correlated with psychiatric disorders, such as schizophrenia, in both animal model (Deloulme et al., 2015; Rünker et al., 2011) and human (Goghari et al., 2014; Lee et al., 2013).

The proper connection between subiculum and mammillary bodies through the post-commissural part of the fornix has been shown to be under the control of semaphorin 3E (Sema3E) guidance cue (Bellon et al., 2010; Chauvet et al., 2007). This member of secreted class of semaphorin family is bi-functional, acting as attractive or repulsive guidance cue depending on the neuron type. The attractive pathway of Sema3E is implicated in the fornix formation due to a specific receptor complex composition expressed by subicular neurons. This complex is composed of plexin-D1, neuropilin-1 and VEGFR2 (Bellon et al., 2010; Chauvet et al., 2007). Many intracellular effectors of semaphorins signaling pathways have already been identified. For example, kinases such as GSK3 $\beta$ , CDK5 or Rho kinases are known to be activated by semaphorins in order to regulate functions of different microtubule-associated proteins (MAPs) such as CRMPs (Collapsin related mediator proteins) to promote or repress growth cone protrusion (Mitsui et al., 2002; Uchida et al., 2005; Yukawa et al., 2005). CRMPs is a five members family, sharing strong homology of 50% up to 76% of their

amino acid sequence depending on the member (Charrier et al., 2003). CRMP2 has originally been discovered in mammals for its involvement in semaphorin 3A dependent growth cone collapse (Goshima et al., 1995). This family is now considered as a cytoskeleton regulator acting on both microtubule (Fukata et al., 2002; Khazaei et al., 2014; Lin et al., 2011) and actin (Khazaei et al., 2014; Rosslenbroich et al., 2005) networks dynamics modulation. CRMPs have been implicated in many neuronal processes during past decades including neuritic outgrowth (Ji et al., 2014; Khazaei et al., 2014), dendritic arborization (Niisato et al., 2012, 2011; Tam T Quach et al., 2008), axonal regeneration (Alabed et al., 2010, 2007; Leung et al., 2002) and axonal transport (Kimura et al., 2005; Tsuboi et al., 2005). All the CRMP KO mice have been generated (Charrier et al., 2006; Khazaei et al., 2014; Tam T Quach et al., 2008; Yamashita and Goshima, 2012). Studies of these transgenic mice have allowed to confirmed the importance of CRMPs in neuronal development and correlated this function to behavioral impairments (T T Quach et al., 2008; Su et al., 2007; Tsutiya et al., 2015; Yamashita et al., 2013, 2012). Consistently with the animal model, polymorphisms of genes coding for CRMP1, and 2 has been detected in schizophrenic patients (Bader et al., 2012; Beasley et al., 2006). Moreover, alteration of CRMP2 and CRMP4 expression has been found in schizophrenic patients hippocampus (Edgar et al., 2000; Föcking et al., 2011). CRMPs family alteration is now considered as risk factor for psychiatric diseases onset such as Schizophrenia (Quach et al., 2015).

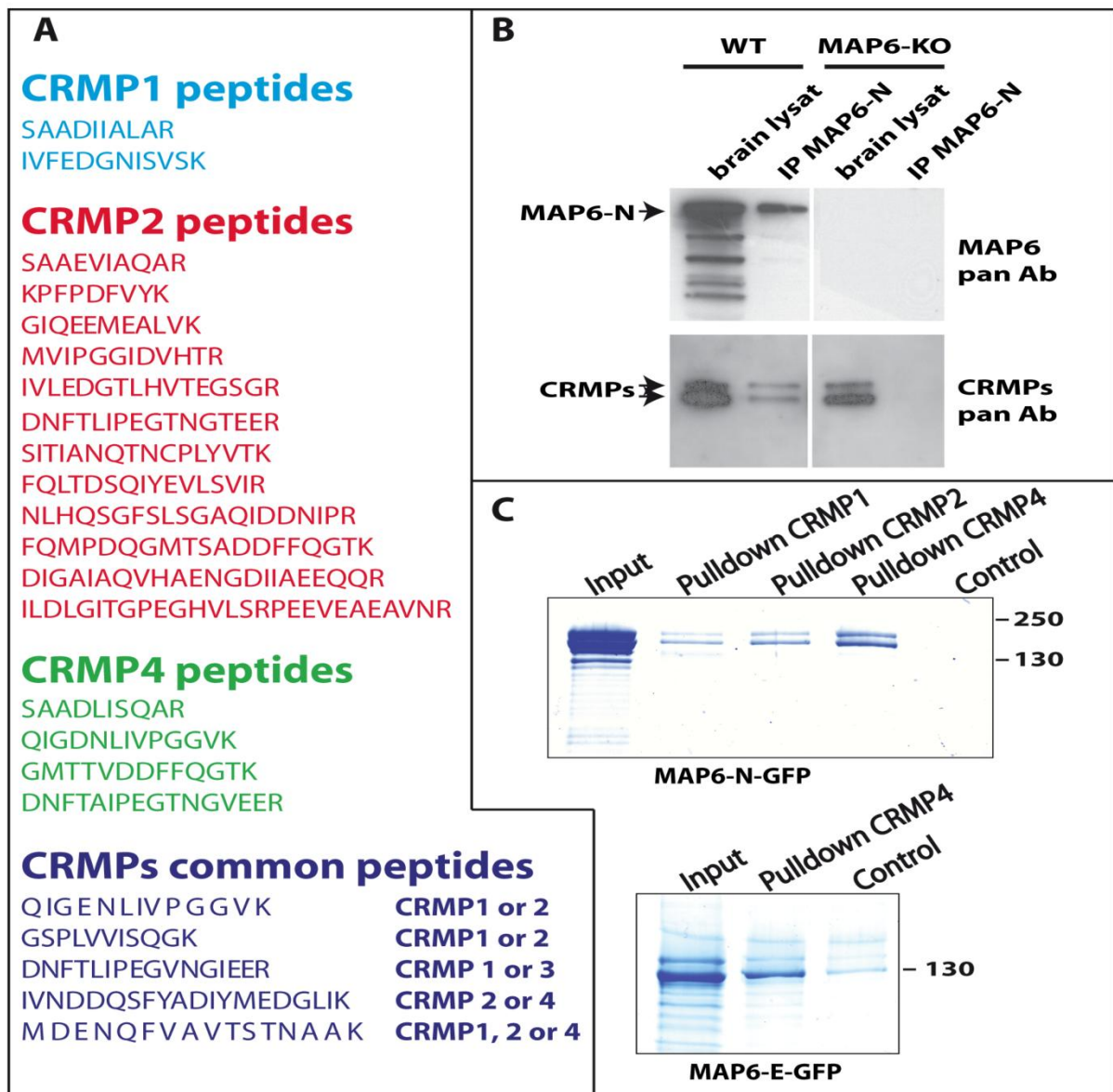
The huge diversity of effectors acting in a single signaling pathway may explain that neuron projections are almost driven one by one to their targets. However, this makes the study of tracts formation or axonal guidance signaling pathways difficult because of the number of candidates implicated. Recently, we have found that the microtubule-associated protein 6 deletion (MAP6-KO) is associated with a lack of post-commissural fornix fibers. MAP6 contributes to fornix development by regulating axonal elongation induced by Sema3E independently of its microtubule-stabilizing properties (Deloulme et al., 2015). In order to discover new major effectors in the formation of the fornix and in Sema3E signaling pathway, we characterized MAP6 partners by immunoaffinity chromatography coupled with mass spectrometry. In this study, we identified CRMP4 as a partner of MAP6 and as an essential effector of Sema3E growth promoting activity. Deletion of CRMP4 is associated with delayed development of post-commissural fornix. Finally, we showed that CRMP4 genetically cooperates with MAP6 and Sema3E in fornix formation during development. Our work suggests that CRMP4 as a MAP and actin-binding protein could be an important effector in the transduction of Sema3E signaling pathway.

## RESULTS

### **CRMP1, 2 and 4 are MAP6 partners.**

In order to identify protein partners of MAP6 involved in Sema3E signaling pathway, we carried out immunoaffinity chromatography experiments coupled with mass spectrometry. Protein extracts from wild type (WT) brains and MAP6 KO brains as a control were flowed through affinity columns conjugated with a monoclonal antibody directed against MAP6-N. Partners were then eluted with an excess of MAP6 peptide containing the epitope targeted by the monoclonal antibody (see Materials and Methods section). WT and MAP6-KO proteins eluted fractions were then analyzed by mass spectrometry and compared to each other to determine specific MAP6 partners. Among peptides identified, those belonging to the CRMP family were particularly interesting since members of this family are involved in the semaphorin 3A signaling pathway (Brown et al., 2004; Goshima et al., 1995; Niisato et al., 2011; Uchida et al., 2009; Yamashita et al., 2007). Twelve specific peptides belonging to CRMP2, 4 peptides to CRMP4 and 2 peptides to CRMP1 isoforms have been identified but no specific peptides of CRMP3 and CRMP5 isoforms were found (Figure 1A). The presence of the CRMPs-MAP6 *in vivo* complex was confirmed by co-immunoprecipitation experiments on adult mouse brain lysate (Figure 1B). To know whether MAP6 and CRMPs directly interacted, pulldown experiments using sepharose beads coupled to recombinant CRMPs were performed. The beads coupled to CRMP4 and in less extend beads coupled to CRMP1 or CRMP2 bound the purified MAP6-N isoform (Figure 1C). Furthermore, beads coupled to CRMP4 also bound the MAP6-E isoform (Figure 1C, lower panel) which is mainly expressed during brain development (Figure 3A). However, the recombinant MAP6-E is less stable than the recombinant MAP6-N and tends to aggregate, yielding a slight signal on the control beads (Figure 1C, lower panel).





**Figure 1: Identification of CRMP1, 2 and 4 as MAP6 partners.**

**A** : List of the CRMPs peptides obtained in 3 independent experiments of anti-MAP6 immuno-affinity chromatography ( ) followed by mass spectrometry analyzes.

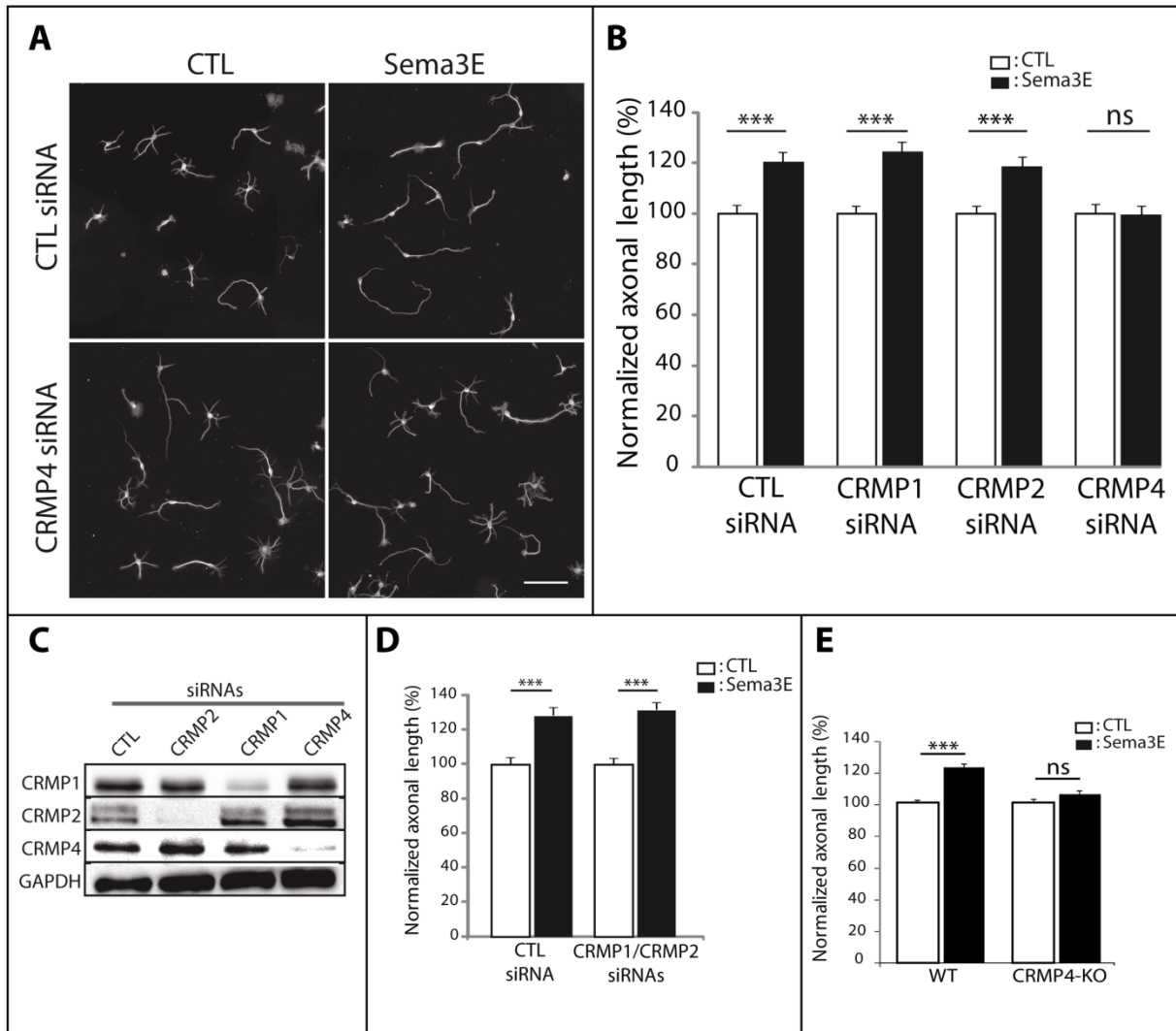
**B** : Immunoprecipitation of endogenous CRMPs from adult mouse brain using Mab 175. CRMPs were revealed using rabbit anti-pan-CRMP antibody and MAP6 using rabbit anti pan-MAP6 antibody. Lysate from MAP6-KO brain was used as control.

**C** : Coomassie gels of pull-down experiments. Control-Sepharose or CRMPs-Sepharose beads were incubated with purified MAP6-N or with MAP6-E tagged GFP proteins. Input lanes correspond to the total amount of MAP6-N (2  $\mu$ g) or MAP6-E (1.5  $\mu$ g) tagged GFP incubated with the CRMPs-Sepharose beads (1.4  $\mu$ g of CRMPs/  $\mu$ l of beads). Molecular weight values are indicated in Kd.

### **CRMP4 is crucial for Sema3E dependent axonal outgrowth stimulation.**

Since CRMPs are involved in the semaphorin 3A signaling and MAP6 in the Sema3E-growth promoting activity, we evaluated the function of MAP6 interacting CRMP isoforms in the axonal response to Sema3E in culture of subicular neurons. As previously reported (Chauvet et al., 2007), application of Sema3E (5 nM) to WT cultured subicular neurons

electroporated with siRNA control for 48 h, induced a 1.2 -fold increase in axon length (Figure 2A and B,  $p < 0.0005$ ). When subicular neurons were treated with CRMPs siRNAs to specifically knockdown CRMP1, CRMP2 or CRMP4 isoforms (Figure 2C), they failed to respond to Sema3E only after treatment with CRMP4 siRNAs (Figure 2A and B). The growth promoting activity of Sema3E was preserved after treatment with CRMP1 or with CRMP2 siRNAs (Figure 2B,  $p < 0.0005$ ) or even after both CRMP1 and CRMP2 siRNAs treatment (Figure 2D;  $p = 0.0005$ ) excluding a possible functional compensation between CRMP1 and CRMP2. Experiments performed with WT and CRMP4-KO subicular neurons yielded to similar results with a 1.22-fold increase in the axon length in WT and no significant response in CRMP4-KO neurons (Figure 2E,  $p < 0.0005$  and  $p = 0.12$  for WT and KO respectively). Together these results indicate a specific role for CRMP4 in the growth promoting activity of Sema3E on subicular neurons.



**Figure 2 : Effect of CRMPs down regulation on Sema3E growth promoting activity**

**A** : Typical images of subicular neurons cultured in the absence (CTL) or in the presence of 5nM Sema3E for 48h, electroporated with control siRNA or CRMP4 siRNA. To measure the axon length, neurons were immunolabeled with anti- $\alpha$ -tubulin. Scale bar, 100  $\mu$ m.

**B** : The histogram shows quantifications of the relative axonal length in subicular neurons treated for 48 h with control siRNA and CRMPs siRNAs in the absence (CTL) or the presence of 5 nM recombinant Sema3E (Sema3E). Error bars, s.e.m, values corresponded to mean axonal length of 225 neuron from 3 independent cultures (75 neurons for each experiments) and normalized to 100% for values obtained in control conditions, t-test, \*\*\*  $p < 0.0005$ . **C** : Western-blot of crude extracts of cultured subicular neurons treated for 48 h with CRMPs siRNA and siRNA control and blotted with CRMPs antibodies and GAPDH antibody. Each CRMP siRNA induced a specific reduction of the corresponding CRMP isoform.

**D** : Quantifications of axonal length in cultured subicular neurons treated for 48 h with control siRNA (20nM) or with a mixture of CRMP1/CRMP2 siRNAs (10nM each) in the absence or the presence of 5 nM recombinant Sema3E. Error bars, s.e.m., values corresponded to mean axonal length of 225 neurons from 3 independent cultures (75 neurons for each experiments) and normalized to 100% for values obtained in control conditions. t-test, \*\*\*  $p < 0.0005$ .

**E** : Quantifications of axonal length in cultured WT and CRMP4-KO subicular neurons in the absence (CTL) or the presence of 5 nM recombinant Sema3E. Error bars, s.e.m., values corresponded to mean axonal length of 225 neurons from 3 independent cultures (75 neurons for each experiments) and normalized to 100% for values obtained in control conditions. t-test, \*\*\*  $p < 0.0005$ .

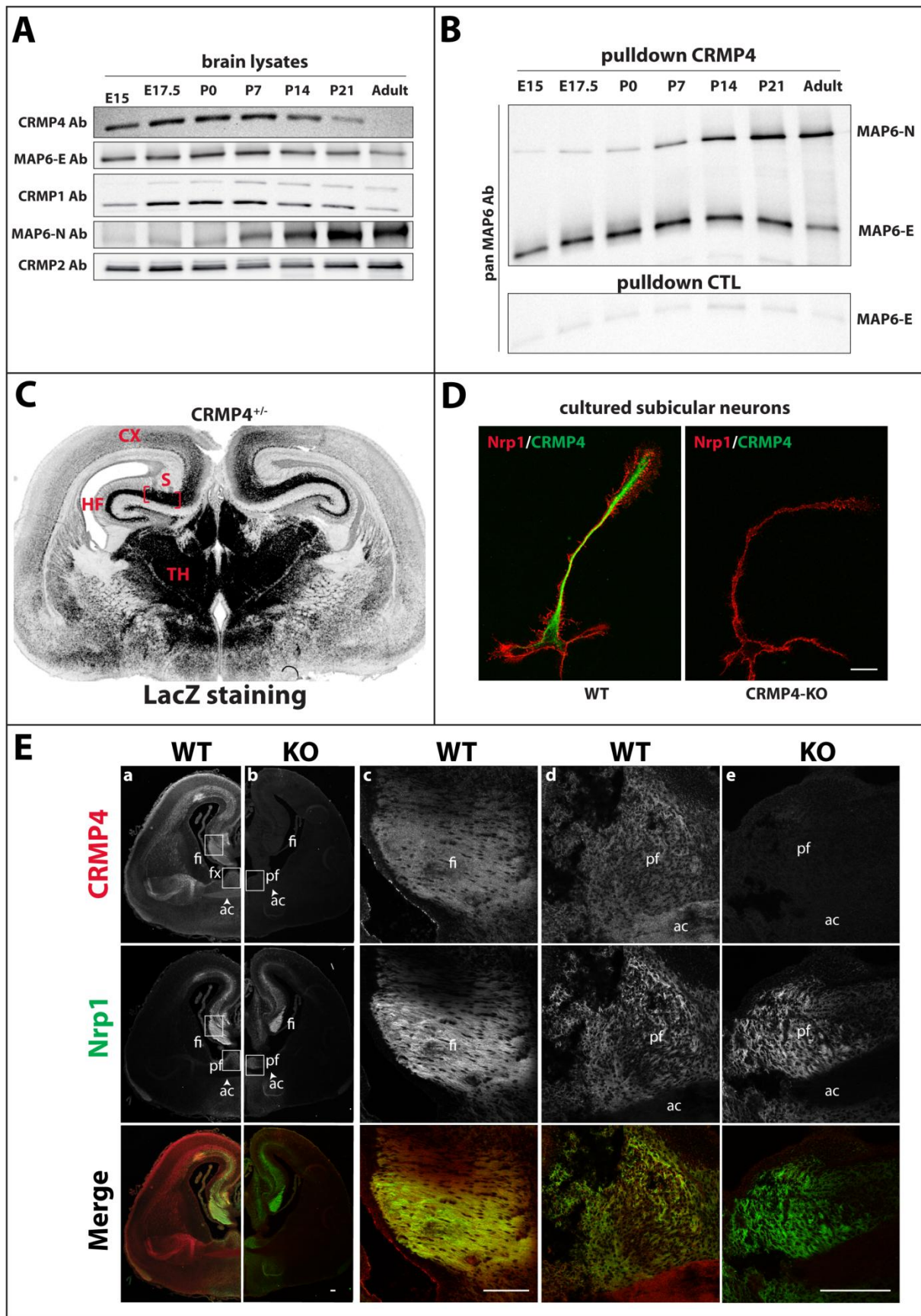
### **CRMP4 is expressed by subicular neurons during post-commissural fornix formation.**

To assess whether CRMP4 influences the fornix formation, we first investigated its expression and localization during embryonic development of the mouse brain. As reported in the rat brain (Byk et al., 1998), CRMP4 was predominantly expressed during embryonic and post-natal development between embryonic day 17.5 (E) and post-natal day 7 (P), and then declined sharply in the adult brain (Figure 3A). The expression pattern of CRMP4 was similar to that of CRMP1 and MAP6-E but differed from CRMP2 whose expression persisted in adult brain and from MAP6-N whose expression only started postnatally (Figure 3A). Pulldown experiments using CRMP4-Sepharose beads on the cerebral extracts during development clearly showed that the affinity of CRMP4 for both MAP6-E and MAP6-N isoforms was similar (Figure 3B). We next investigated the pattern of the CRMP4 gene expression in developing brain using LacZ reporter gene inserted in the CRMP4 locus (Khazaei et al., 2014) (Figure 3C). The 1DIV cultured subicular neurons expressing Nrp1 receptor at their surface at 1DIV, strongly expressed CRMP4 in all cell areas including cell body, axon and growth cone (Figure 3D). At E17.5 the development of the fornix is not achieved, the CRMP4 gene was strongly expressed at the hippocampal formation including CA1, CA2, CA3 and subiculum, in thalamic regions and to a lesser extent in cortical areas (Figure 3E). Consistent with the CRMP4 gene expression, the CRMP4 protein was localized in neuronal tracts such as the anterior commissure mostly constituted from cortical projections and the in Nrp1 positive projections such as the fimbria-fornix and post-commissural fornix which were mostly constituted from subicular projections (Figure 3C column a). In higher magnification, the CRMP4 immuno-labeling aspect was diffused and lightly puncted in Nrp1 positive projections (Figure 3E columns c and d). This puncted and diffused immuno-labeling aspect was specific since it was absent in mouse CRMP4-KO brain sections (Figure 3E, columns b and e). As expected, our analysis indicates that CRMP4 is strongly expressed in subicular neurons and in their projections forming the post-commissural fornix.

### **Mapping the minimal interaction domains for CRMP4 on MAP6.**

To investigate which domains of MAP6 are responsible for the CRMP4 binding, the full-length protein and the indicated mutants of MAP6-N tagged GFP (Figure 4A) were overexpressed in HEK 293 cells and we compared their interaction with CRMP4-Sepharose beads (Figure 4B-D), as described in “Materials and Methods”. The N-terminal domain of MAP6 (MAP6-Nt 1/174) bound CRMP4 sepharose beads more efficiently than the full length





**Figure 3 : CRMP4 expression in subicular neurons and fornix projections**

**A** : Expression of CRMPs and neuronal MAP6 isoforms in embryonic (E15, E17.5), post-natal (P0-P14) and adult brains detected by Western blot using specific antibodies revealed CRMPs and MAP6s isoforms.

**B** : Pulldowns of MAP6-E and MAP6-N from embryonic, post-natal and adult brains using CRMP4-Sepharose (upper panel) and control-Sepharose beads (lower panel).. Western blot using a pan-MAP6 antibody revealed both MAP6-N and MAP-E isoforms.

**C** : CRMP4 gene expression was revealed by X-gal staining on coronal brain section from CRMP4<sup>+/-</sup> mice at E17.5. The subiculum (flanked with red brackets) presents a strong  $\beta$ -galactosidase activity. Abbreviations: TH, thalamus; S, subiculum; HF, hippocampal formation; CX, cortex.

**D** : Coronal sections of E17.5 WT (columns a) and CRMP4-KO (columns b) brain were double immunolabeled with anti-CRMP4 and anti-Neuropilin1 (Nrp1) antibodies. White squares (columns a and b) indicate the position of microscopic field shown in columns c-e.

Abbreviations: fi, fimbria; pf, post-commissural fornix; ac, anterior commissure. Scale Bars, 100  $\mu$ m

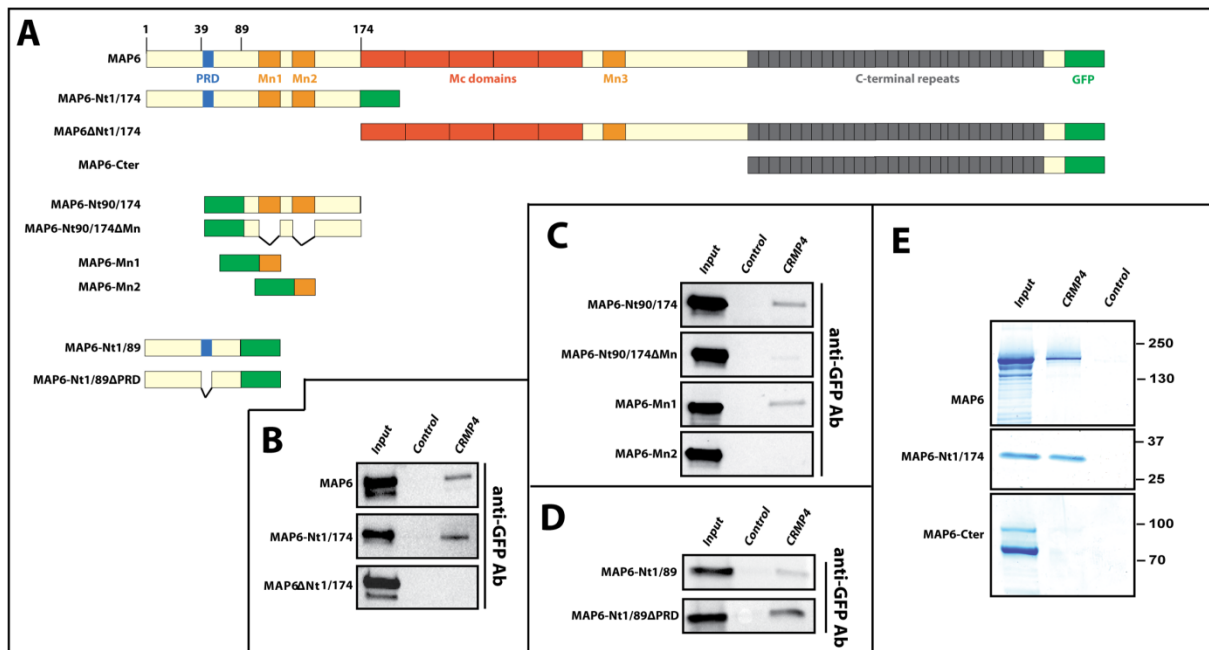
**E** : Cultured subicular neurons at 2 DIV were double-immuno-labeled with anti-CRMP4 and anti-Neuropilin1 (Nrp1) antibodies. Scale bar, 20  $\mu$ m.

MAP6 binding to CRMP4 beads (Figure 4B). The deletion of the N-terminal domain (MAP6 $\Delta$ -Nt 1/174) totally abolished binding with CRMP4 beads (Figure 4B). These findings demonstrated that the N-terminal domain of MAP6 is crucial for its interaction with CRMP4. The N-terminal domain of MAP6 contains two binding site for microtubules (Mn1 and Mn2) (Bosc et al., 2001) and a poly-proline rich domain (PRD) essential for the Sema3E growth promoting activity (Deloulme et al., 2015). To investigate a possible role of these domains in binding to CRMP4 beads, we produced two proteins, the first one containing both Mn1 and Mn2 domains (MAP6-Nt 90/174) and the second containing the PRD domain (MAP6-Nt1/89) (Figure 4A). Both mutants slightly interacted with CRMP4 beads (Figure 4C and D). Deletions of both Mn1 and Mn2 (MAP6 Nt90/174 $\Delta$ Mn) abolished the binding. Furthermore, only Mn1 but not Mn2 was able to significantly bind CRMP4 beads (Figure 4C). In opposite, the deletion of PRD (MAP6-Nt1/89 $\Delta$ PRD) strongly increased binding to CRMP4 beads compared with MAP6-Nt1/89 mutant (Figure 4D). In order to investigate the role of the N-terminal domain of MAP6 for its direct interaction with CRMP4, recombinant proteins were produced in insect cells (Figure 4E). Again, the N-terminal domain bound more efficiently to the CRMP4 beads than the full length of MAP6 while the C-terminal domain did not. Almost all the MAP6-Nt-1/174 loaded was adsorbed to CRMP4 beads suggesting that folding or conformational state of MAP6 could play a role in regulating its interaction with CRMP4. Together, our results show that the N-terminal domain (MAP6-Nt-1/174) is essential for binding on CRMP4 and that Mn1 and PRD domains could participate to this function.

### **CRMP4 is required for fornix integrity**

To determine whether the deletion of CRMP4 gene could impact the post-commissural fornix, we performed immunofluorescence labeling on WT and CRMP4-KO slices brain from P0 littermate pups using antibodies directed against the neuropilin-1 (Nrp1). At this





**Figure 4: Mapping of the MAP6-binding domain on CRMP4.**

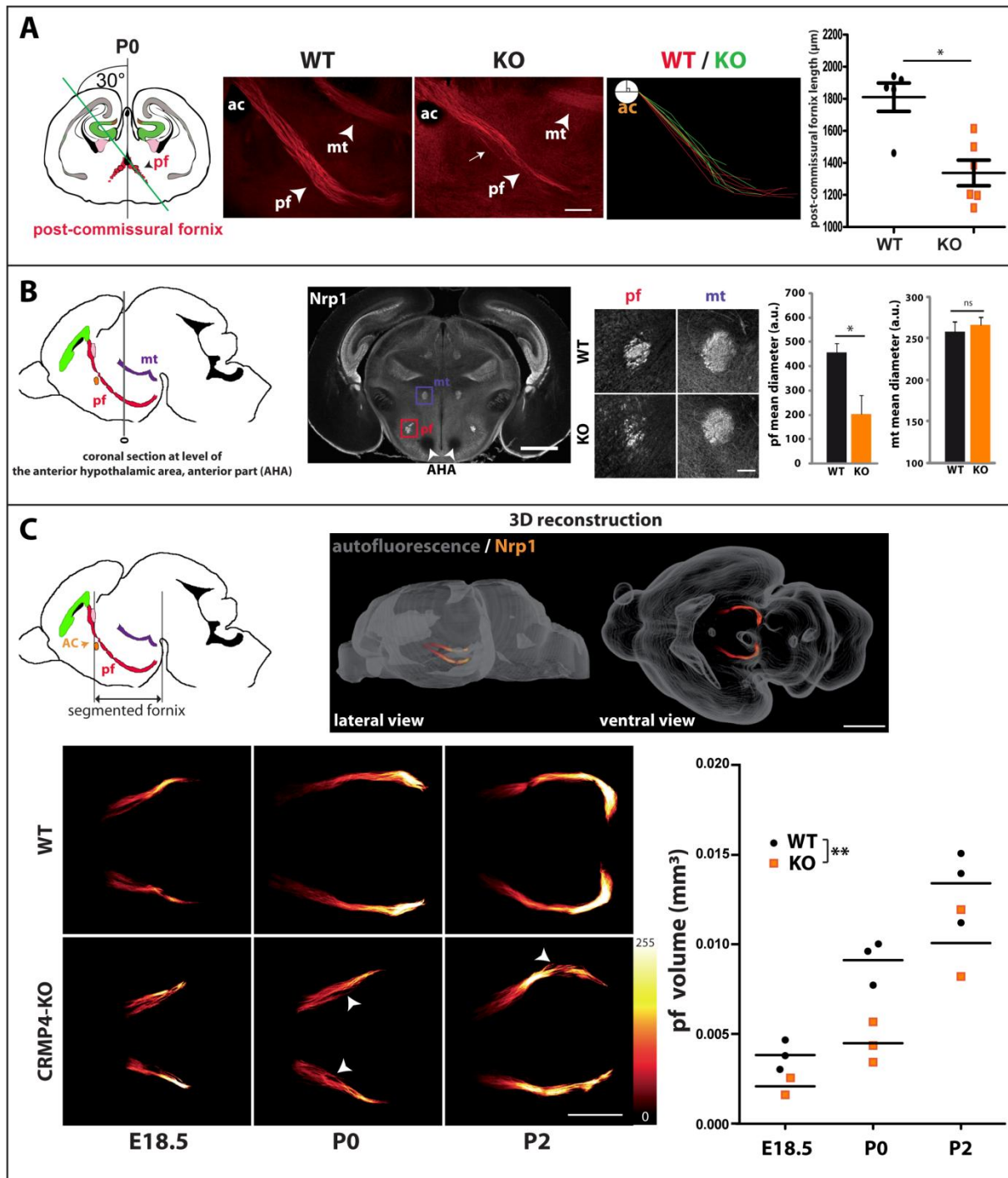
**A :** Domain diagram of MAP6-N. MAP6-N contains different domains including a proline-rich domain (PRD), eight microtubule-binding domains (Mn and Mc) and a C-terminal repeat domain. Abbreviation, GFP, green fluorescent protein.

**B-D :** Pulldowns of MAP6-tagged GFP and mutants of MAP6-tagged GFP expressed in HEK 293T17 cells using CRMP4-Sepharose beads. Control-Sepharose (control lane) or CRMP4-Sepharose beads (CRMP4 lane) were incubated with HEK cell lysate expressing MAP6-N or mutants of MAP6. Input lanes correspond to the total amount of lysate (about 20  $\mu$ g) incubated with the Sepharose beads. Mutants- and MAP6-tagged GFP were revealed by western blot using an anti-GFP antibody.

**E :** Pulldowns of recombinant MAP6-tagged GFP and mutants of MAP6-tagged GFP proteins using CRMP4-Sepharose beads. Control-Sepharose (control lane) or CRMP4-Sepharose beads (CRMP4 lane) were incubated with recombinant proteins produced in insect cells. Input lanes correspond to the total amount of recombinant proteins (2  $\mu$ g) incubated with the Sepharose beads. Mutants- and MAP6-tagged GFP were revealed on Coomassie gel. Molecular weight are indicated in Kd.

developmental stage, the projections forming the post-commissure pass behind the anterior commissure to project through the anterior hypothalamus and terminate into the posterior hypothalamus at level of mammillary bodies (Figure 5B, sagittal diagram). To visualize the entire post-commissural fornix and analyze its axon bundling, we prepared sagittal slices with a cutting angle of 30° (Figure 5A, coronal diagram). The length of post-commissural fornices was measured using the anterior commissure as a starting point. (Figure 5A, ac). In CRMP4-KO pups, the post-commissural fornix was reduced by 26% (Figure 5A, histogram,  $p = 0.0173$ ), appeared more de-fasciculate than in WT pups and showed axon bundles splitting off (Figure 5C, observed 3/6 KO, white arrow). In order to obtain a better quantitative estimate of fornix defects, its diameter was measured at P0 on coronal sections selected on the onset of the anterior part of the anterior hypothalamic area (AHA) (Figure 5D, black arrowhead). We chose the AHA as anatomical landmark for its precision and its proximity to the post-





**Figure 5 : Effect of CRMP4 KO on post-commissural fornix formation.**

**A :** Sagittal sections with a cutting angle of 30° of P0 WT and KO brain were immunostained with anti-Neuropilin1 (Nrp1) antibody. The coronal diagram shows the projection stack of post-commissural fornix in red on a coronal plan. The green line indicates the plane of the sagittal sections. The length of post-commissure fornices were measured using ImageJ and by using the anterior commissure as the starting point. All measured traces from WT (n= 6; red) and KO (n = 5; green) were superposed and shown in the right panel. The histogram shows quantifications of post-commissural fornices. Scale bar, 250  $\mu\text{m}$ . Error bars, s.e.m. Mann and Whitney test, \*  $p < 0.05$

**B:** Coronal sections corresponding to the onset of the anterior part of the anterior hypothalamus area (AHA) of P0 WT and KO were immuno-labeled with anti-neuropilin (Nrp1) antibody. The sagittal diagram shows the projection stack of post-commissural fornix (pf; red) and mammillothalamic tract (mt, purple) and the grey line indicates the level of coronal plan. Fornix and mammillothalamic tract were squared in their respective color.

Scale bar, 1 mm. Higher magnifications show that post-commissural fornix was smaller and more de-fasciculate in KO than in WT while aspect of mammillothalamic tract was unchanged. Scale bar, 100 $\mu$ m. Histograms show quantifications of both fornix and mammillothalamic tract diameters. Error bars, s.e.m. WT n = 6, KO n = 5, Mann and Whitney test, \* p < 0.05

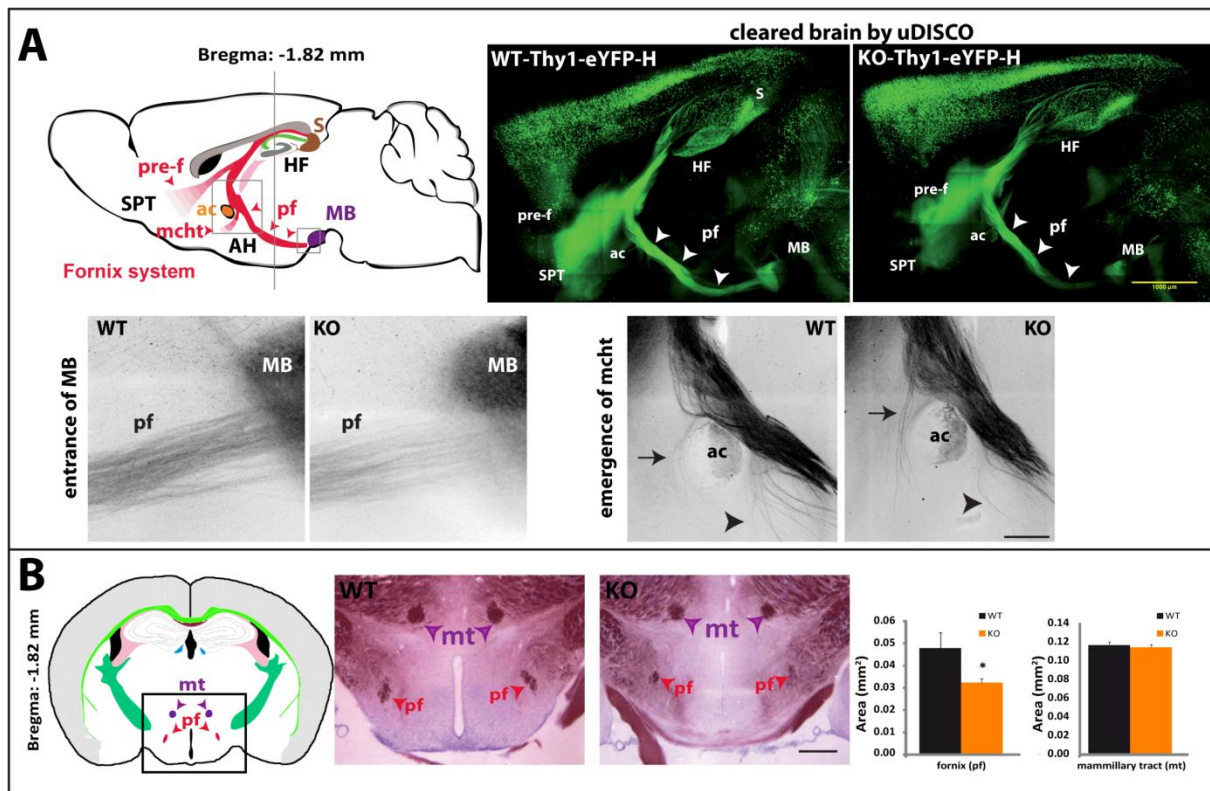
C : Whole brains of WT and KO at E18.5, P0 and P2 were immunolabeled with neuropilin antibody and cleared following the 3DISCO procedure (Belle et al., 2014). The sagittal diagram shows the projection stack of the fornix (pf, red) and black lanes indicate the portion of segmented fornix. The anterior commissure (in orange) was used as the starting point to segment the fornix. Illustration of a P2 segmented fornix 3D reconstruction into the whole brain in lateral view (left panel) and ventral view (right panel) is shown. Scale bar, 1 mm. Representative ventral z projections of WT and KO fornices at E18.5, P0 and P2 are presented. The fluorescence intensity of segmented fornix is represented in red to white color scale depending on fluorescence intensity. White arrowheads point to axon bundle splitting off the fornix Scale bar, 500  $\mu$ m. Histogram shows quantifications of fornix volume at E18.5, P0 and P2 in WT and CRMP4-KO mice. voxel size: x = 2.07, y = 2.07, z = 6.55  $\mu$ m; Bars indicate the mean volume. ANOVA two way, \*\*p < 0.01.

Abbreviations : pf, post-commissural fornix; ac, anterior commissure

commissural fornix limiting the bias due to differences in dorso-ventral positioning of brains during slicing. The diameter of the fornix was reduced by 55% in CRMP4-KO mice while the diameter of the neighboring mammillothalamic tract remained unchanged arguing for a specific function of CRMP4 on fornix formation (Figure 5B, histograms, p = 0.027). To get a global view of the post-commissural fornix, we performed cleared brain immunofluorescence labeling using Nrp1 antibodies on whole brain at E18.5, P0 and P2 developmental stage. The post-commissural fornices were manually segmented and 3D reconstructed using anterior commissures as anatomical cues to determine the onset of post-commissural fornices (Figure 5C, sagittal diagram and 3D reconstruction). CRMP4 KO post-commissural fornices volumes were smaller at all developmental stages than those from WT littermates (Figure 5C). Furthermore, in CRMP4-KO, post-commissural fornices were often de-fasciculate with some axon bundles unusually splitting off the tract (Figure 5C white arrowheads, observed on 2/9 WT and 7/8 KO). Finally, the quantification of post-commissural fornix volume showed a significant global decrease of 46% in CRMP4-KO brains. In fact, no significant interaction was detected between genotype and stage of development using an Anova two-way analysis (p=0.33). Thus, we were able to compare independently the effect of genotype and stage of development on brains volume. Obviously, significant interaction between volume and stage of development was showed (p=0.0001), and also between volume and genotype (p=0.0017). Altogether, results showed that the deletion of CRMP4 gene delays the embryonic and the post-natal development of the post-commissural fornix.

We also asked whether this developmental delay observed in CRMP4-KO mice could have consequences on the fornix integrity in adulthood. The post-commissural fornix is mainly composed by projection of the subiculum and belongs to the fornix system, which is a major





**Figure 6 : Deletion of CRMP4 affect the fornix integrity of adult brain.**

**A**: Clearing adult half-brains from WT- and KO-Thy1-eYFP-H mice by uDISCO method (Pan et al., 2016). Sagittal diagram shows the fornix system (red region). Gray line indicates the Bregma position; in mm of the coronal diagram shown in B. Gray squares indicate regions shown in higher magnifications corresponding to post-commissural fornix entrance in mammillary bodies and to emergence of the mcht. Representative large panoramic views of z projections of WT and KO are presented. Scale bar, 1 mm. Voxel size,  $x = 2.07$ ,  $y = 2.07$ ,  $z = 5.77 \mu\text{m}$ . Higher magnifications of z projections show post-commissural fornix fibers (pf) entering in mammillary bodies (MB) and mcht fibers emerging from fornix. Arrows and arrowheads indicate the mcht fiber emerging from anterior side and from the posterior side of the anterior commissure (ac) respectively. Scale bar,  $200 \mu\text{m}$ .

**B**: Coronal brain sections from adult WT and KO were stained with gold chloride. Schema of adult brain coronal slice illustrating anatomical level selected to measure fornix (pf) and mamillo-thalamic tract (mt) surface. The square indicates the region shown on the coronal sections stained with gold chloride. Surfaces of fornices and mamillothalamic tracts were performed with ImageJ. Histograms show surface quantifications. Error bar, s.e.m. WT = 5, KO = 5. Mann and Whitney test, \*  $p < 0.05$ . Scale bar,  $250 \mu\text{m}$ .

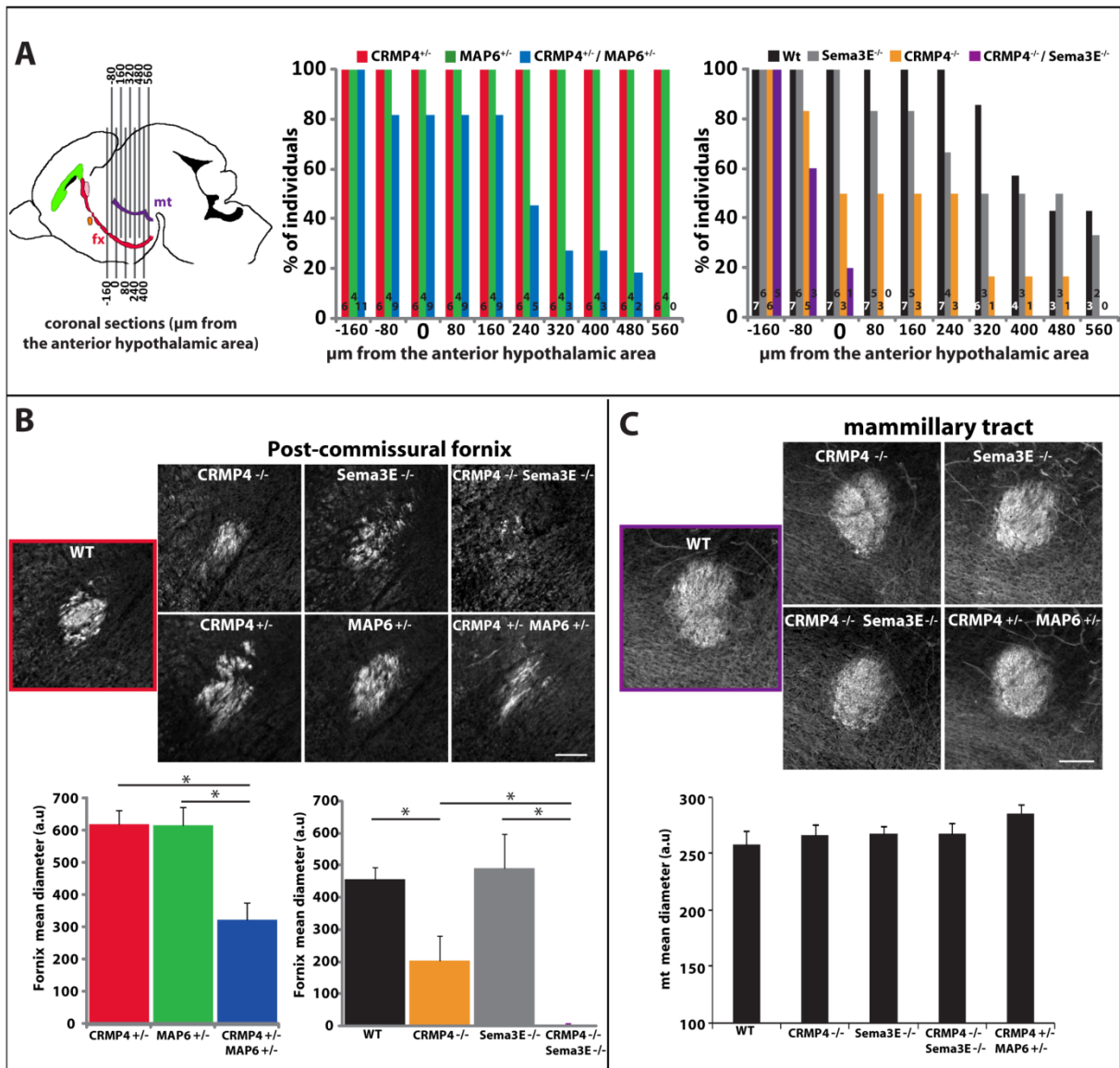
Abbreviations: HF: hippocampal formation; MM: mammillary body; AH: anterior hypothalamus; SPT: septum; pre-f: pre-commissural fornix; post-f: post-commissural fornix; mcht, medial-corticohypothalamic tract and ac: anterior commissure.

output of the hippocampal formation. This complex neuronal tract is composed of three major efferent tracts: the pre-commissural fornix (pre-f), which is rostral to the anterior commissure (ac) and projects into septal regions (SPT); and the post-commissural fornix (post-f), which passes behind the anterior commissure, innervates the anterior hypothalamus (AH) through the medial-corticohypothalamic tract (mcht) and terminates at the posterior hypothalamus in the mammillary body (MB) (Figure 6A, sagittal diagram). To analyze the post-commissural

fornix anatomy in adult, the Thy1-eYFP-H transgene, which is strongly expressed by neurons of the hippocampal formation including the subiculum (Porrero et al., 2010), was introduced in CRMP4 mice line by breeding. In order to preserve YFP endogenous fluorescence, adult brains from WT- and KO-Thy1-eTFP-H mice were cleared using the uDISCO method (Pan et al., 2016). The post-commissural fornix in CRMP4-KO mice was complete and connected to the mammillary body; nevertheless, it appeared thinner and more diffuse at its distal part than in WT (Figure 6A, phenotype observed in 3/3 KO). Clearing method provides more accurate pictures of neuronal tract than conventional histology methods. Analysis of fornix at the entrance of mammillary bodies suggested a loss of fibers in KO mice (Figure 6A). At the anterior commissure, where mcht projections emerge, differences appear on both knockout mice. Axon bundles emerging on the posterior side of the anterior commissure appeared sparse (Figure 6A, arrowhead), while those emerging on the anterior side of the anterior commissure were denser in the KO mice than in the WT mice (Figure 6A, arrowhead). These results suggest the presence of misrouting in KO mice. Finally, to measure diameters of the post-commissural fornices, we performed myelin sheath staining using gold chloride on adult coronal sections. In accordance with our developmental study, the absence of CRMP4 induced a decrease of 32 to 42 % of surface of the post-commissural fornix fibers depending on the proximo-distal level of the observations (Figure 5B-C,  $p = 0.032$  and  $0.015$  respectively), without variation of mammillothalamic tract surface of fiber in adult brain. Together, results strongly suggest that developmental delay formation impact on the fornix integrity in adult brain.

#### **CRMP4 cooperates with MAP6 and Sema3E during fornix formation.**

We previously showed that the formation of the post-commissural fornix was delayed in Sema3E/MAP6 double heterozygote mice but not in the respective single heterozygote mice (Chauvet et al., 2007; Deloulme et al., 2015) suggesting the existence of a strong cooperation between MAP6 and Sema3E during fornix development. To estimate a possible *in vivo* genetic cooperation between CRMP4 and Sema3E or MAP6 during fornix development, we bred CRMP4 mouse line with Sema3E or MAP6 mouse lines and performed analyses of trans-heterozygous animals. The distal post-commissural fornix was analyzed anteriorly and posteriorly to the onset of the AHA used as a reference point (Figure 7A, sagittal diagram and Figure 5B). A strong delay of fornix formation was observed in double CRMP4/MAP6 heterozygous animals compare to each single CRMP4 or MAP6 heterozygous mice (Figure 7A, left histogram). The existence of cooperation between MAP6 and CRMP4 was



**Figure 7 : Genetic interaction between CRMP4, MAP6 and Sema3E proteins.**

**A :** Coronal sections of trans-heterozygotes (CRMP4/MAP6) and trans-homozygote (CRMP4/Sema3E) pups were immunolabeled with neuropilin 1 antibody. Sagittal diagram of P0 brain shows the projection stack of the post-commissural fornix (pf in red) and of mammillothalamic tract (mt in purple). Gray lines indicate the position in  $\mu\text{m}$  of the coronal sections analyzed from the reference coronal slice corresponding to the anterior part of the anterior hypothalamus (slice 0  $\mu\text{m}$ , see also Figure 4B). Histograms show quantifications of the caudal and the rostral extension of the post-commissural fornix from the reference slice (0  $\mu\text{m}$ ). No post-commissural fornices belonging to the CRMP4<sup>+/-</sup> / MAP6<sup>+/-</sup> or CRMP4<sup>-/-</sup> /Sema3E<sup>-/-</sup> pups reached the mammillary bodies (section 560  $\mu\text{m}$ ). Number of individuals for each genotype is indicated.

**B and C:** Measurement of post-commissural fornix and mammillothalamic tract diameter at the level of the reference brain section (section 0, see also Figure 4B) in trans-heterozygotes and trans-homozygote pups after neuropilin immunolabeling. Histograms show quantification of the diameter of fornix and mammillothalamic tract for each genotype.. Error bar, s.e.m. Mann and Whitney test, \*  $p < 0.05$ . Scale bar, 100  $\mu\text{m}$ .

strengthened by measuring the diameter of fornices at the anatomical level corresponding to the onset of the AHA (Figure 7A, sagittal diagram, slice 0). The diameter in the double heterozygote was reduced by 48% and by 47% compared with single heterozygotes CRMP4<sup>+/-</sup>

and MAP6<sup>+/-</sup> respectively (Figure 7B, p = 0.025 and 0.03 respectively).

Since the analysis of the CRMP4 / Sema3E double heterozygote showed no significant difference with single heterozygotes (data not shown), we had generated the double homozygote CRMP4 / Sema3E in order to compare it to single homozygotes. A delay of fornix formation was observed in CRMP4/Sema3E-KO pups and at a lesser extent in CRMP4- and Sema3E-KO pups (Figure 7A, right histogram). At level of the AHA, post-commissural fornices were almost absent in double-KO mice, restricted to a few scattered axon bundles (Figure 7B). Diameters of fornices were severely reduced in CRMP4-KO mice while not affected in Sema3E-KO mice at P0. Nevertheless, we observed a strong defasciculation of fornices at the AHA level (Figure 7B) and in all posterior and anterior slices (data not shown) examined in Sema3E-KO pups. As previously shown for CRMP4-KO mice (Figure 5B) and for MAP6-KO mice (Deloulme et al., 2015), diameters of mammillothalamic tracts were unchanged in all genotype analyzed (Figure 7C). Together, our results strongly suggest the existence of genetic cooperation between CRMP4, MAP6 and Sema3E in fornix formation.



## DISCUSSION

In this study, we show for the first time the importance of MAP6/CRMP4 interaction for neuronal growth promoted by Sema3E. We showed that as MAP6 and Sema3E, CRMP4 is necessary during neurodevelopment for the proper outgrowth of axons composing the fornix.

Based on the combined use of immunoaffinity chromatography and mass spectrometry, we identified CRMP family members 1, 2 and 4 as MAP6 partners. Using similar approaches other laboratories found MAP6 peptides, as CRMP4 partners (A. Fournier, unpublished results) or as CRMP2 partners (Martins-de-Souza et al., 2015) thus strengthening the presence of complexes between MAP6 and CRMPs *in vivo*. In our study, the number of identified CRMP2 peptides was greater than CRMP1 and CRMP4 peptides. This is certainly explained by the fact that the chromatography was done with adult brains extracts, when CRMP1 and CRMP4 are down-regulated. Moreover, our study shows that CRMPs/MAP6 protein complexes are formed by a direct interaction of these proteins. By analysis of truncated mutant, we determined that MAP6 binds to CRMP4 by its N-terminal domain. Interestingly from pulldown experiments, this N-terminal domain has a stronger affinity for CRMP4 than the full length MAP6 suggesting a possible regulation by masking of the binding domain by the C-terminal region. The N-terminal domain contains Mn1 and Mn2 modules which independently interact and stabilize microtubules (Bosc et al., 2001; Lefèvre et al., 2013). Interestingly, we identified Mn1 module as a sufficient domain of interaction with CRMP4 while the neighboring Mn2 module does not interact. Our results suggest a possible regulation by CRMP4 of MAP6 binding to microtubule through Mn1 module. In its N-terminal domain, MAP6 contains also a proline rich domains (PRD), these domains were likely candidates for interaction with SH2 and/or SH3-containing proteins involved in Sema3E signalization. Accordingly, the N-terminus of MAP6 binds to the SH3 domains of the PI3K subunit P85, and the PRD of MAP6 is required for the Sema3E growth promoting activity (Deloulme et al., 2015; Morderer et al., 2012). Because the deletion of the PRD enhanced MAP6 interaction with CRMP4, we presumed that proteins containing SH2/SH3 domain interacting with the PRD of MAP6 can influence MAP6 to CRMP4 interaction. In other words, Sema3E through its action on PI3K might directly regulate CRMP4/MAP6 complex formation.

To our knowledge, this study presents the first temporal expression profile of CRMP4 in mouse brain and our results correlate with those presented for the expression profile of CRMP4 and its mRNA in rat brain (Quinn et al., 2003; Wang and Strittmatter, 1996). MAP6-



E early isoform and CRMP4 are co-expressed at the time of fornix formation (E14-E15) suggesting a cooperation of these proteins for the fornix development. However, no differences in the interaction between the MAP6-E or MAP6-N, the late isoform, and CRMP4 are evident in our pull down experiments. This suggests other brain functions for CRMP4/MAP6s. The complex between MAP6 and CRMPs could play a role at the post-synaptic level and both proteins are involved in neuronal plasticity in adults. MAP6-KO and CRMP1-KO mice show LTP defects associated with spatial learning and memory defects (Bégou et al., 2008; Bouvrais-Veret et al., 2007; Su et al., 2007). Activation of PI3K through its regulatory subunit P85, essential in integrating AMPARs receptors during LTP, could again play a role in the regulation of the complex between MAP6 and CRMPs (Man et al., 2003). At pre-synaptic level, MAP6 and CRMPs also shares many important molecular targets for synaptic transmission. MAP6 and CRMP2 are both capable of interacting with calcium channel  $CaV_{2.2}$  and modulating its subcellular localization (Brocard et al., 2017; Chi et al., 2009). CRMP4 and MAP6 also bind intersectin, a SH3 containing protein involved in synaptic vesicle recycling (Morderer et al., 2012; Quinn et al., 2003).

The neuro-anatomy of CRMP4 KO mice has been partially investigated. A previous study has reported dendritic arborization defect on hippocampal CA1 and cortical pyramidal neurons (Niisato et al., 2011) and more recently a study described altered layering of olfactory bulb at P0 characterized by a decrease of the mitral cell layer width associated with a defect of mitral dendritic arborization (Tsutiya et al., 2016). Here we have demonstrated by three different approaches the post-commissural fornix formation delay in CRMP4 KO mice. Simultaneous mammillo-thalamic tract observations showed its susceptibility to CRMP4 KO and argue specificity of CRMP4 for fornix formation. Finally, CRMP4, MAP6 and Sema3E mice line interbreeding demonstrated cooperation between those three genes in fornix formation regulation. In the light of the necessity of CRMP4 and MAP6 for Sema3E induced axonal outgrowth on subicular neurons, the increased fornix formation delay observed in double CRMP4/Sema3E KO and in double CRMP4/MAP6 heterozygotes strongly confirm their involvement on Sema3E signaling pathway.

Interestingly, the screening of MAP6 partners by immunoaffinity chromatography reveals only the CRMP family members (CRMP1, 2 and 4) involved in the Sema3A axonal repellent activity (Alabed et al., 2007; Goshima et al., 1995; Uchida et al., 2005). The first evidence for the involvement of CRMPs in Sema3A signaling came from the identification of CRMP62 the homologue of CRMP2 in chicken (Goshima et al., 1995). CRMP1 2 and 4 were shown to stimulate neurite elongation (Brot et al., 2010; Cha et al., 2016; Quach et al., 2004; Tan et al.,

2015) and this stimulation involved the microtubule assembly and stability induced by those CRMPs (Fukata et al., 2002; Khazaei et al., 2014; Lin et al., 2011). The interaction between CRMP1 or 2 and microtubules is inhibited by GSK3 $\beta$  or CDK5 phosphorylation (Uchida et al., 2005; Yamashita and Goshima, 2012; Yoshimura et al., 2005). Sema3A which stimulates those GSK3 $\beta$  and CDK5 phosphorylation of CRMP1 and 2 would lead to the formation of phosphorylated CRMPs inactive form promoting the repulsive effect of Sema3A through growth cone collapse (Brown et al., 2004; Uchida et al., 2005). To our knowledge, this is the first time a CRMPs family member such as CRMP4 is involved in a semaphorin signaling other than Sema3A and in an axonal growth promoting activity of guidance cues such as Sema3E. The fact that MAP6 interacts with the three CRMPs involved in repellent activity of Sema3A also suggests that MAP6 could play a role in this signaling pathway. In light of our results, CRMPs MAP6 partners could be important for the diversification of guidance effects and thus a mediation of a large spectrum of wiring events.

## MATERIALS AND METHODS

### *Ethical approval and Animals*

All experiments involving animals were conducted in accordance with the policy of the Grenoble Institute of Neurosciences (GIN) and the French legislation; experiments were done in compliance with the European Community Council Directive of 24 November 1986 (86/609/EEC). The research involving animals was authorized by the Direction Départementale de la protection des populations-Préfecture de l'Isère-France (Deloulme J. C., PhD, permit number 380822) and by the ethics committee of GIN n° 004 accredited by the French Ministry for of Research.

Homozygotes CRMP4-KO and their wild type (WT) littermates were obtained by crossing pure heterozygote C57BL6-F1 CRMP4 mice. Homogeneous inbred C57BL6/129SvPas-F1 mice were obtained by crossing MAP6 pure heterozygote 129SvPas male or female mice with MAP6 pure heterozygote C57BL6 male or female mice. Pure double-homozygote inbred C57BL6 CRMP4/Sema3E-KO and their WT littermates mice were obtained by firstly crossing C57BL6 CRMP4-KO with C57BL6 Sema3E-KO in order to produce pure double heterozygote inbred C57BL6-F1 CRMP4<sup>+/-</sup>/Sema3E<sup>+/-</sup> which were then interbreed. Double-heterozygote inbred C57BL6/129vPas-F1 CRMP4<sup>+/-</sup>/MAP6<sup>+/-</sup> mice were obtained by crossing C57BL6 CRMP4<sup>+/-</sup> with 129SvPas MAP6<sup>+/-</sup>. Th1-eYFP line H mice (Feng et al., 2000) were obtained from Jackson Labs (B6.Cg- Tgn (Thy-YFP-H) 2Jrs) and crossed with pure heterozygote C57BL6 CRMP4 mice to generate heterozygote C57BL6/Thy1-eYFP CRMP4 mice colony. These mice were then crossed with heterozygote C57BL6 CRMP4 mice to generate WT/ and KO/Thy1-eYFP-H littermate mice in pure inbred C57BL6-F1. Male and/or females mice were used from E18.5 prenatal day up to 6 month old depending of the experiments.

### *Antibodies*

The following primary antibodies were used: rabbit pan-MAP6 Ab diluted to 1:1000 (home made, 23N), mouse MAP6-N Ab diluted to 1:1000 (Home made, mAb175), rabbit MAP6-E Ab diluted 1:1000 (Home made, Ab E), rabbit pan-CRMPs Ab diluted to 1:10000 directed against the C-terminal end of CRMP2 and recognized CRMP1, 2 and 4 isoforms (Home made, C-ter), rabbit CRMP1 diluted to 1: 800 was generously gift by V. Rogemond, rabbit CRMP4 Ab diluted to 1:10000 and 1:4000 in Western blot and immunofluorescence-labelling respectively (Millipore, TUC-4), Mouse CRMP2 Ab diluted to 1: 1000 (IBL, Clone C4G),

rabbit GFP Ab diluted to 1/2000 (Life technologies, A-11122), Goat Nrp1 Ab diluted to 1:500 (R and D, AF566). Secondary antibodies were donkey anti-rabbit Alexa 488 and donkey anti-goat Alexa 488-coupled (Molecular Probes), donkey anti-rabbit Cy3 and bovine anti-goat Cy3-coupled (Jackson Immuno Research).

#### *Brain preparation*

Adult brains adult mice were fixed by transcardiac perfusion of a 4% PFA solution as describe (Daoust et al., 2014). Brains were extracted and stored in the same fixative solution overnight at 4 °C. Embryos and perinatal pups were decapitate and brain were extracted then fixed by incubation into a 4% PFA solution at 4°C for 4-5h. All brains were then incubated in 15% then in 30% Sucrose solutions for 12h at 4°C before freezing at -80°C using dry-ice alcohol-bath of iso-pentane (Carlo Erba). Brains were sliced at 30 $\mu$ m using cryomicrotome (Microm, H560S) and mounted on Superfrost plus slides (Menzel-Gläser).

#### *White matter staining*

Coronal sections from C57BL6 CRMP4 mice were stained using the gold chloride method of Schmued (Schmued et al., 2008). Briefly, sections were rinsed three times in PBS and incubated with 0.2% gold chloride for 2 h at room temperature. To stop the reaction, sections were incubated in 2.5% sodium thiosulfate, which was diluted in distilled water, for 5 min. After three rinses in PBS, each section was digitized (stereo microscope EZ4 HD, Leica Biosystem, Nanterre, France) and analyzed using the ImageJ's software. Fornical fibers were manually threshold in order to measure pixel surfaces of fornix cross-sections (Schindelin et al., 2012).

#### *$\beta$ -Galactosidase activity staining*

Coronal brain sections (40  $\mu$ m) from CRMP4 mice at E17.5 were incubated in PBS containing 5 mM potassium ferricyanide, 5mM potassium ferrocyanide, 2mM magnesium chloride and 1 mg/mL X-Gal as substrate for 12 h at room temperature (RT). Sections were dehydrated in successive ethanol baths and slides were mounted in DPX mounting medium (Sigma).

#### *Neuropilin 1 and CRMP4 immunolabeling*

Brain sections (40  $\mu$ m) from embryos and pups were permeabilized in PBS-gts containing 0.1% Triton X100, 0.05% Saponin, 0.2% gelatin for 1h and extensively washed with PBS.

Rabbit anti-CRMP4 antibodies (Millipore, TUC-4, AB5454) and/or Goat anti-Neuropilin 1 antibodies (R and D, AF566) were diluted in PBS-gts at 1:4000 and 1:800 respectively and incubated overnight at RT. Brain sections were extensively washed with PBS and then incubated with a mixture of secondary antibodies coupled with Alexa 488 (Invitrogen) or with Cyanin 3 (Jackson Labs) for 2h at RT. Sections were extensively washed with PBS and slides were mounted with fluorescent mounting medium (DAKO).

#### *Assessment of the post-commissural fornix*

Coronal sections (40  $\mu\text{m}$ ) and sagittal sections with a cutting angle of 30° from P0 littermate mice were immunolabeled with goat anti-neuropilin 1. At least 5 pups per genotype groups were used for quantification of mean diameter or for post-commissural length. Diameter measurement of post-commissural fornix and mammillothalamic tract were performed on the same section corresponding to the onset of the anterior part of the anterior hypothalamic area (AHA) as anatomical cue to normalize the level of the measurement between each genotype. Each section was digitized using an optic microscope (Axioskop 50, Zeiss) that was equipped with a 20x dry objective and an EMCCD Quantum camera that was driven by the Metamorph software (Roper Scientific, Every, France). All morphometric measures were performed using ImageJ software.

#### *Brain clearing methods*

Brains from WT and CRMP4 KO littermate pups (E18.5-P2) were clarified using 3DISCO method (Belle et al., 2014). Briefly, brains were defrosted and rehydrated in PBS at 4°C on a wheel for 4h and then permeabilized into a PBS-gts buffer containing 0.2% gelatine, 0.5% Triton X100, 0.1% Saponin and 0.01% Thimerosal overnight at 37°C. Brains were then incubated 1 week rotating on a wheel at 37°C with anti-Nrpl primary antibody (R&D system; 1:400) diluted into PBS-gts buffer. Brains were then washed twice in PBS-gts for 12h at 37°C and incubated 1 week rotating on a wheel at 37°C with anti-Goat Cy3-conjugated secondary antibody (Jackson Lab; 1:500) diluted into PBS-gts. Brains were washed twice for 20mn and then overnight in PBS-gts at 37°C. Brains were then dehydrate by successive incubation into 50%/80%/100%/100% Tetrahydrofuran (Sigma, THF) at RT. Finally the brains were delipided in dichloro-methane (DCM) until sinking and cleared in dibenzyl-ether (Sigma, DBE) overnight at RT.

Adult half-brains from WT/Thy1-eYFP-H and CRMP4 KO/Thy1-eYFP-H mice were clarified following uDISCO procedure (Pan et al., 2016). Briefly brains were defrosted and

rehydrated in PBS at 4°C on a wheel for 4h. Brains were then dehydrated by successive incubation into tert-butanol (Sigma, 360538) at 30%, 50%, 70%, 80%, 90% and 96 Vol% for 12h at 37°C. Finally the brains were delipided in dichloro-methane until sinking and cleared in BABB-D10 supplemented with 0.4% of vitamin E (Alfa Aesar, A17039) overnight at RT. BABB-D10 was made using BABB solution composed of benzyl alcohol (Sigma, 24122) mixed with benzyl benzoate (Sigma, W213802) at 1:2 ratio, and adding into BABB solution the diphenyl ether (DPE) (Alfa Aesar, A15791) at 10 (BABB):1 DPE ratio.

Whole brains from pups and adult half-brains were acquired by using confocal (LSM710, Zeiss) with 10X dry objective (N.A: 0.3; WD: 5.5 mm).

### *Neuron culture*

Brains from WT and KO CRMP4 littermate embryos (E17.5) were dissected to the subiculum. Pieces were dissociated and plated onto polylysine/laminin-coated four-well plates (Nunc) in Neurobasal medium supplemented with 1mM glutamine, 1:50 B27 (GIBCO), and control AP or Sema3E-AP (6.3 nM) supernatants. In some experiments, neurons were electroporated with different siRNAs (100 pmol). Efficient knockdown of CRMP1, 2 and 4 was obtained using Stealth RNAi (Invitrogen), siRNA anti-CRMP1 sequence 50-CCC GGU GGC AUU GAU GUC AAC ACU U-30 (si-CRMP1), siRNA anti-CRMP2 sequence 50-CCA ACC ACU CCA GAC UUU CUC AAC U-30 (si-CRMP2), siRNA anti-CRMP4 sequence 50-CCU CUG GUG GUU AUC UGC CAG GGC A-30 (si-CRMP4). After 2DIV, cultured cells were fixed and immunostained with an anti-tubulin antibody as described. Measure of axonal length in the presence or in the absence of Sema3E was performed using ImageJ's software plugin "NeuronJ" (Meijering et al., 2004).

### *Immunoaffinity chromatography*

Purified monoclonal antibodies directed against MAP6-N (Mab 175, 10 mg) were coupled on Aminolink coupling gel column (Thermo Scientific) following manufacturer's instructions.

WT and MAP6-KO adult brains (20 of each) were lysed in 8 ml of PEM buffer (100 mM pipes adjusted to pH 6.75 with KOH; 1 mM EGTA; 1 mM MgCl<sub>2</sub> and protein cocktail inhibitor from Roche) by first 6 strokes with the type A pestle and then 2 strokes with type B pestle of a Kontes all glass Dounce homogenizer at 4°C. Homogenates were centrifuged at 70 000 rpm for 10 min and supernatants were incubated with 1 ml of Mab-175-aminolink gel for 3 min at 4°C with gentle agitation. Mab-175-aminolink gels were extensively washed with



PEM buffer containing 50 mM NaCl and bound proteins were eluted with 4 ml of peptide-175 (1 mM in PEM buffer).

#### *In-gel digestion and mass spectrometry*

Proteins from more concentrated eluted fractions were stacked by SDS-PAGE in a 2 mm-high band and stained with Coomassie blue. Protein bands were manually excised from the gels, proteins digested in-gel with trypsin, and resulting peptides extracted using a sample preparation robot (EVO150, Tecan) as previously described (Jaquinod et al., 2007). Extracted peptides were analyzed by nano-liquid chromatography coupled to tandem mass spectrometry (Ultimate 3000, Dionex and LTQ-Orbitrap Discovery, Thermo Fischer) and identified using Mascot software (Matrix Science) and the Uniprot database as described in (Bernay et al., 2009). Proteins identified with a minimum score of 35 were automatically validated using IRMa software (Dupierris et al., 2009). Functions of identified proteins were assessed using Generic GO Term Mapper (<http://go.princeton.edu>).

#### *Co-immunoprecipitation and pull-down*

For Immunoprecipitation experiments, adult brains were homogenate with lysis buffer (20mM Tris, 1mM EGTA, 1mM EDTA, 5mM NaF, 1mM DTT, 0.27M sucrose, 0.5% Triton X-100, pH 7.2) in the presence of protease inhibitors (Complete Cocktail tablets, Roche). After mechanical lysis using ceramic beads shacking and centrifugation of the cell lysate at 12,000 g for 20 min at 4°C, the supernatant was diluted 3x with buffer C (2% glycerol, 10mM Tris-HCL pH 7.5) and incubated for 4 h at RT with 20  $\mu$ g Mab MAP6 (175) (Bosc et al., 1996).

For pull-down experiments, HEK-293 T17 (ATCC) cells were transfected with MAP6-N-GFP or mutants of MAP6 cDNAs using a calcium phosphate kit (LifeTechnologies). One day after transfection, cells were scraped with PEM buffer (100mM Pipes, 1mM EDTA, 1mM EDTA, 1mM MgCl<sub>2</sub>, 100mM KCl, 0.05% Tween, pH 7.5) in the presence of protease inhibitors (Complete Cocktail tablets, Roche). After mechanical lysis using ceramic beads shacking and centrifugation of the cell lysate at 12,000 g for 20 min at 4°C, the supernatant was incubated for 30min at RT with 5  $\mu$ l of control-Sepharose or CRMP4-Sepharose beads. Beads were then washed 3 times with PEM buffer. Same protocol and buffers were used for pull-down experiment performed with recombinant MAP6 proteins.

#### *Production of Sema3E-AP*

HEK293T cells were transfected with the Sema3E-AP vector or empty pAPtag-5 vector as control, using a calcium phosphate kit (LifeTechnologies). After 3 days of culture in Opti-MEM serum-free medium (Gibco), the supernatant was collected and concentrated at 180 nM using Centricon filters (Millipore). AP activity was measured using SIGMAFASTt p-nitrophenyl phosphate tablets (Sigma Aldrich), as per the manufacturer's instructions.

#### *Statistical analysis*

Statistics were performed using the Prism 5.0 software (GraphPad Software) using tests as indicated in each figure. Statistic comparison between AP and Sema3E-AP treated neuron axonal lengths were done by Student test after verification of variance equality and verification of normal low shape of the values.

## REFERENCES:

- Alabed, Y.Z., Pool, M., Ong Tone, S., Fournier, A.E., 2007. Identification of CRMP4 as a convergent regulator of axon outgrowth inhibition. *J. Neurosci.* 27, 1702–11. doi:10.1523/JNEUROSCI.5055-06.2007
- Alabed, Y.Z., Pool, M., Ong Tone, S., Sutherland, C., Fournier, A.E., 2010. GSK3 beta regulates myelin-dependent axon outgrowth inhibition through CRMP4. *J. Neurosci.* 30, 5635–5643. doi:10.1523/JNEUROSCI.6154-09.2010
- Andrzejewski, M.E., Spencer, R.C., Kelley, A.E., 2006. Dissociating Ventral and Dorsal Subicular Dopamine D1 Receptor Involvement in Instrumental Learning, Spontaneous Motor Behavior, and Motivation. *Behav. Neurosci.* 257, 2432–2437. doi:10.1016/j.immuni.2010.12.017.Two-stage
- Bader, V., Tomppo, L., Trossbach, S. V., Bradshaw, N.J., Prikulis, I., Rutger Leliveld, S., Lin, C.Y., Ishizuka, K., Sawa, A., Ramos, A., Rosa, I., García, Á., Requena, J.R., Hipolito, M., Rai, N., Nwulia, E., Henning, U., Ferrea, S., Luckhaus, C., Ekelund, J., Veijola, J., Järvelin, M.R., Hennah, W., Korth, C., 2012. Proteomic, genomic and translational approaches identify CRMP1 for a role in schizophrenia and its underlying traits. *Hum. Mol. Genet.* 21, 4406–4418. doi:10.1093/hmg/dd273
- Beasley, C.L., Pennington, K., Behan, A., Wait, R., Dunn, M.J., Cotter, D., 2006. Proteomic analysis of the anterior cingulate cortex in the major psychiatric disorders: Evidence for disease-associated changes. *Proteomics* 6, 3414–3425. doi:10.1002/pmic.200500069
- Bégou, M., Volle, J., Bertrand, J.B., Brun, P., Job, S., Schweitzer, A., Saoud, M., D'Amato, T., Andrieux, A., Suaud-Chagny, M.F., 2008. The stop null mouse model for schizophrenia displays cognitive and social deficits partly alleviated by neuroleptics. *Neuroscience* 158, 1742. doi:10.1016/j.neuroscience.2008.11.003
- Belle, M., Godefroy, D., Dominici, C., Heitz-Marchaland, C., Zelina, P., Hellal, F., Bradke, F., Chédotal, A., 2014. A simple method for 3D analysis of immunolabeled axonal tracts in a transparent nervous system. *Cell Rep.* 9, 1191–201. doi:10.1016/j.celrep.2014.10.037
- Bellon, A., Luchino, J., Haigh, K., Rougon, G., Haigh, J., Chauvet, S., Mann, F., 2010. VEGFR2 (KDR/Flk1) signaling mediates axon growth in response to semaphorin 3E in the developing brain. *Neuron* 66, 205–219. doi:10.1016/j.neuron.2010.04.006
- Bernay, B., Gaillard, M.-C., Guryca, V., Emadali, A., Kuhn, L., Bertrand, A., Detraz, I., Carcenac, C., Savasta, M., Brouillet, E., Garin, J., Elalouf, J.-M., 2009. Discovering new bioactive neuropeptides in the striatum secretome using in vivo microdialysis and versatile proteomics. *Mol. Cell. Proteomics* 8, 946–58. doi:10.1074/mcp.M800501-MCP200
- Bosc, C., Cronk, J.D., Piroletti, F., Wattrerson, D.M., Haiechii, J., Job, D., Margolis, R.L., 1996. Cloning, expression, and properties of the microtubule-stabilizing protein STOP 93, 2125–2130.
- Bosc, C., Frank, R., Denarier, E., Ronjat, M., Schweitzer, A., Wehland, J., Job, D., 2001. Identification of Novel Bifunctional Calmodulin-binding and Microtubule-stabilizing Motifs in STOP Proteins. *J. Biol. Chem.* 276, 30904–30913. doi:10.1074/jbc.M011614200
- Bouvrais-Veret, C., Weiss, S., Andrieux, A., Schweitzer, A., McIntosh, J.M., Job, D., Giros, B., Martres, M.-P., 2007. Sustained increase of alpha7 nicotinic receptors and choline-induced improvement of learning deficit in STOP knock-out mice. *Neuropharmacology* 52, 1691–700. doi:10.1016/j.neuropharm.2007.03.015
- Brocard, J., Dufour, F., Gory-Fauré, S., Arnoult, C., Bosc, C., Denarier, E., Peris, L., Saoudi, Y., De, M.W., Andrieux, A., 2017. MAP6 interacts with Tctex1 and Cav2.2/N-type calcium channels to regulate calcium signaling in neurons. *Eur. J. Neurosci.* in press.
- Brot, S., Rogemond, V., Perrot, V., Chounlamountri, N., Auger, C., Honnorat, J., Moradi-Ameli, M., 2010. CRMP5 Interacts with Tubulin to Inhibit Neurite Outgrowth, Thereby Modulating the Function of CRMP2. *J. Neurosci.* 30, 10639–10654. doi:10.1523/JNEUROSCI.0059-10.2010
- Brown, M., Jacobs, T., Eickholt, B., Ferrari, G., Teo, M., Monfries, C., Qi, R.Z., Leung, T., Lim, L., Hall, C., 2004. Alpha2-chimaerin, cyclin-dependent Kinase 5/p35, and its target collapsin response mediator protein-2 are essential components in semaphorin 3A-induced growth-cone collapse. *J. Neurosci.* 24, 8994–9004. doi:10.1523/JNEUROSCI.3184-04.2004
- Bubb, E.J., Kinnavane, L., Aggleton, J.P., 2017. Hippocampal–diencephalic–cingulate networks for memory and emotion: An anatomical guide. *Brain Neurosci. Adv.* 1, 239821281772344. doi:10.1177/2398212817723443

- Byk, T., Ozon, S., Sobel, A., 1998. The Ulip family phosphoproteins--common and specific properties. *Eur. J. Biochem.* 254, 14–24.
- Cha, C., Zhang, J., Ji, Z., Tan, M., Li, S., Wu, F., Chen, K., Gong, S., Guo, G., Lin, H., 2016. CRMP4 regulates dendritic growth and maturation via the interaction with actin cytoskeleton in cultured hippocampal neurons. *Brain Res. Bull.* 124, 286–294. doi:10.1016/j.brainresbull.2016.06.008
- Charrier, E., Aguera, M., Thomasset, N., Honnorat, J., 2003. Collapsin Response Mediator Proteins ( CRMPs ). *Mol. Neurobiol.* 28, 51–63.
- Charrier, E., Mosinger, B., Meissirel, C., Aguera, M., Belin, M., Goshima, Y., Honnorat, J., Thomasset, N., 2006. Transient alterations in granule cell proliferation , apoptosis and migration in postnatal developing cerebellum of 1337–1352. doi:10.1111/j.1365-2443.2006.01024.x
- Chauvet, S., Cohen, S., Yoshida, Y., Fekrane, L., Livet, J., Gayet, O., Segu, L., Buhot, M.C., Jessell, T.M., Henderson, C.E., Mann, F., 2007. Gating of Semaphorin 3E/PlexinD1 Signaling by Neuropilin-1 Switches Axonal Repulsion to Attraction during Brain Development. *Neuron* 56, 807–822. doi:10.1016/j.neuron.2007.10.019
- Chi, X.X., Schmutzler, B.S., Brittain, J.M., Wang, Y., Hingtgen, C.M., Nicol, G.D., Khanna, R., 2009. Regulation of N-type voltage-gated calcium channels (Cav2.2) and transmitter release by collapsin response mediator protein-2 (CRMP-2) in sensory neurons. *J. Cell Sci.* 122, 4351–4362. doi:10.1242/jcs.053280
- Daoust, A., Bohic, S., Saoudi, Y., Debacker, C., Gory-Fauré, S., Andrieux, A., Barbier, E.L., Deloulme, J.C., 2014. Neuronal transport defects of the MAP6 KO mouse - a model of schizophrenia - and alleviation by Epothilone D treatment, as observed using MEMRI. *Neuroimage* 96, 133–142.
- De Peri, L., Crescini, A., Deste, G., Fusar-Poli, P., Sacchetti, E., Vita, A., 2012. Brain structural abnormalities at the onset of schizophrenia and bipolar disorder: a meta-analysis of controlled magnetic resonance imaging studies. *Curr. Pharm. Des.* 18, 486–494.
- Deloulme, J.-C., Gory-Fauré, S., Mauconduit, F., Chauvet, S., Jonckheere, J., Boulan, B., Mire, E., Xue, J., Jany, M., Maucler, C., Deparis, A.A., Montigon, O., Daoust, A., Barbier, E.L., Bosc, C., Deglon, N., Brocard, J., Denarier, E., Le Brun, I., Pernet-Gallay, K., Vilgrain, I., Robinson, P.J., Lahrech, H., Mann, F., Andrieux, A., 2015. Microtubule-associated protein 6 mediates neuronal connectivity through Semaphorin 3E-dependent signalling for axonal growth. *Nat. Commun.* 6, 7246. doi:10.1038/ncomms8246
- Dent, E.W., Gupton, S.L., Gertler, F.B., 2011. The Growth Cone Cytoskeleton in Axon outgrowth and guidance.pdf. *Cold Spring Harb. Perspect. Biol.* 1–40. doi:10.1101/cshperspect.a001800
- Dupierris, V., Masselon, C., Court, M., Kieffer-Jaquinod, S., Bruley, C., 2009. A toolbox for validation of mass spectrometry peptides identification and generation of database: IRMa. *Bioinformatics* 25, 1980–1. doi:10.1093/bioinformatics/btp301
- Edgar, P.F., Douglas, J.E., Cooper, G.J., Dean, B., Kydd, R., Faull, R.L., 2000. Comparative proteome analysis of the hippocampus implicates chromosome 6q in schizophrenia. *Mol. Psychiatry* 5, 85–90.
- Feldheim1, D.A., O’Leary, D.D.M., 2010. Visual Map Development : Bidirectional Signaling, Bifunctional Guidance Molecules, and Competition. *Cold Spring Harb. Lab. Press* 1–20. doi:10.1101/cshperspect.a001768
- Feng, G., Mellor, R.H., Bernstein, M., Keller-Peck, C., Nguyen, Q.T., Wallace, M., Nerbonne, J.M., Lichtman, J.W., Sanes, J.R., 2000. Imaging neuronal subsets in transgenic mice expressing multiple spectral variants of GFP. *Neuron* 28, 41–51. doi:10.1016/S0896-6273(00)00084-2
- Fletcher, B.R., 2006. Fornix Lesions Decouple the Induction of Hippocampal Arc Transcription from Behavior But Not Plasticity. *J. Neurosci.* 26, 1507–1515. doi:10.1523/JNEUROSCI.4441-05.2006
- Föcking, M., Dicker, P., English, J. a, Schubert, K.O., Dunn, M.J., Cotter, D.R., 2011. Common proteomic changes in the hippocampus in schizophrenia and bipolar disorder and particular evidence for involvement of cornu ammonis regions 2 and 3. *Arch. Gen. Psychiatry* 68, 477–488. doi:10.1001/archgenpsychiatry.2011.43
- Fukata, Y., Itoh, T.J., Kimura, T., Ménager, C., Nishimura, T., Shiromizu, T., Watanabe, H., Inagaki, N., Iwamatsu, A., Hotani, H., Kaibuchi, K., 2002. CRMP-2 binds to tubulin heterodimers to promote microtubule assembly. *Nat. Cell Biol.* doi:10.1038/ncb825
- Goghari, V.M., Billiet, T., Sunaert, S., Emsell, L., 2014. A diffusion tensor imaging family study of the fornix in

- schizophrenia. *Schizophr. Res.* 159, 435–440. doi:10.1016/j.schres.2014.09.037
- Goshima, Y., Nakamura, F., Strittmatter, P., Strittmatter, S.M., 1995. Collapsin-induced growth cone collapse mediated by an intracellular protein related to UNC-33. *Nature* 509–514.
- Hazlett, E.A., Goldstein, K.E., Kolaitis, J.C., 2012. A Review of Structural MRI and Diffusion Tensor Imaging in Schizotypal Personality Disorder. *Curr. Psychiatry Rep.* 14, 70–78. doi:10.1007/s11920-011-0241-z
- He, Z., Tessier-Lavigne, M., 1997. Neuropilin is a receptor for the axonal chemorepellent semaphorin III. *Cell* 90, 739–751. doi:10.1016/S0092-8674(00)80534-6
- Herman, J.P., Mueller, N.K., 2006. Role of the ventral subiculum in stress integration. *Behav. Brain Res.* 174, 215–224. doi:10.1016/j.bbr.2006.05.035
- Jaquinod, M., Villiers, F., Kieffer-Jaquinod, S., Hugouvieux, V., Bruley, C., Garin, J., Bourguignon, J., 2007. A Proteomics Dissection of *Arabidopsis thaliana* Vacuoles Isolated from Cell Culture. *Mol. Cell. Proteomics* 6, 394–412. doi:10.1074/mcp.M600250-MCP200
- Ji, Z., Tan, M., Gao, Y., Zhang, J., Gong, X., Guo, G., Lin, H., 2014. CRMP-5 interacts with tubulin to promote growth cone development in neurons. *Int. J. Clin. Exp. Med.* 7, 67–75.
- Khazaei, M.R., Girouard, M.-P., Alchini, R., Ong Tone, S., Shimada, T., Bechstedt, S., Cowan, M., Guillet, D., Wiseman, P.W., Brouhard, G., Cloutier, J.F., Fournier, A.E., 2014. Collapsin Response Mediator Protein 4 Regulates Growth Cone Dynamics through the Actin and Microtubule Cytoskeleton. *J. Biol. Chem.* 289, 30133–43. doi:10.1074/jbc.M114.570440
- Kimura, T., Watanabe, H., Iwamatsu, A., Kaibuchi, K., 2005. Tubulin and CRMP-2 complex is transported via Kinesin-1. *J. Neurochem.* 93, 1371–1382. doi:10.1111/j.1471-4159.2005.03063.x
- Lee, S.-H., Kubicki, M., Asami, T., Seidman, L.J., Goldstein, J.M., Meshulam-Gately, R.I., McCarley, R.W., Shenton, M.E., 2013. Extensive white matter abnormalities in patients with first-episode schizophrenia: A diffusion tensor imaging (DTI) study. *Schizophr. Res.* 143, 231–238. doi:10.1016/j.schres.2012.11.029
- Lefèvre, J., Savarin, P., Gans, P., Hamon, L., Clément, M.J., David, M.O., Bosc, C., Andrieux, A., Curmi, P.A., 2013. Structural basis for the association of MAP6 protein with microtubules and its regulation by calmodulin. *J. Biol. Chem.* 288, 24910–24922. doi:10.1074/jbc.M113.457267
- Leung, T., Ng, Y., Cheong, A., Ng, C.H., Tan, I., Hall, C., Lim, L., 2002. p80 ROK binding protein is a novel splice variant of CRMP-1 which associates with CRMP-2 and modulates RhoA-induced neuronal morphology. *FEBS Lett.* 532, 445–449. doi:10.1016/S0014-5793(02)03736-5
- Lin, P.-C.C., Chan, P.M., Hall, C., Manser, E., 2011. Collapsin response mediator proteins (CRMPs) are a new class of microtubule-associated protein (MAP) that selectively interacts with assembled microtubules via a taxol-sensitive binding interaction. *J. Biol. Chem.* 286, 41466–41478. doi:10.1074/jbc.M111.283580
- Man, H.-Y., Wang, Q., Lu, W.-Y., Ju, W., Ahmadian, G., Liu, L., D'Souza, S., Wong, T.P., Taghibiglou, C., Lu, J., Becker, L.E., Pei, L., Liu, F., Wymann, M.P., MacDonald, J.F., Wang, Y.T., 2003. Activation of PI3-kinase is required for AMPA receptor insertion during LTP of mEPSCs in cultured hippocampal neurons. *Neuron* 38, 611–24.
- Martins-de-Souza, D., Cassoli, J.S., Nascimento, J.M., Hensley, K., Guest, P.C., Pinzon-Velasco, A.M., Turck, C.W., 2015. The protein interactome of collapsin response mediator protein-2 (CRMP2/DPYSL2) reveals novel partner proteins in brain tissue. *PROTEOMICS - Clin. Appl.* 9, 817–831. doi:10.1002/prca.201500004
- McIntosh, A.M., Hall, J., Lymer, G.K.S., Sussmann, J.E.D., Lawrie, S.M., 2009. Genetic risk for white matter abnormalities in bipolar disorder. *Int. Rev. Psychiatry* 21, 387–393. doi:10.1080/09540260902962180
- Meijering, E., Jacob, M., Sarria, J.-C.F., Steiner, P., Hirling, H., Unser, M., 2004. Design and validation of a tool for neurite tracing and analysis in fluorescence microscopy images. *Cytometry* 58A, 167–176. doi:10.1002/cyto.a.20022
- Mitsui, N., Inatome, R., Takahashi, S., Goshima, Y., Yamamura, H., Yanagi, S., 2002. Involvement of Fes / Fps tyrosine kinase in semaphorin3A signaling. *EMBO J.* 21.
- Morderer, D., Nikolaienko, O., Skrypka, I., Cherkas, V., Tsyba, L., Belan, P., Rynditch, A., 2012. Endocytic adaptor protein intersectin 1 forms a complex with microtubule stabilizer STOP in neurons. *Gene* 505, 360–364. doi:10.1016/j.gene.2012.06.061
- Morris, R.G.M., Schenk, F., Tweedie, F., Jarrard, L.E., 1990. Ibotenate Lesions of Hippocampus and/or Subiculum: Dissociating Components of Allocentric Spatial Learning. *Eur. J. Neurosci.* 2, 1016–1028.

doi:10.1111/j.1460-9568.1990.tb00014.x

- Niisato, E., Nagai, J., Yamashita, N., Abe, T., Kiyonari, H., Goshima, Y., Ohshima, T., 2011. CRMP4 suppresses apical dendrite bifurcation of CA1 pyramidal neurons in the mouse hippocampus. *Dev. Neurobiol.* 72, 1447–1457. doi:10.1002/dneu.22007
- Niisato, E., Nagai, J., Yamashita, N., Nakamura, F., Goshima, Y., Ohshima, T., 2012. Phosphorylation of CRMP2 is involved in proper bifurcation of the apical dendrite of hippocampal CA1 pyramidal neurons. *Dev. Neurobiol.* 73, 142–151. doi:10.1002/dneu.22048
- Omotade, O.F., Pollitt, S.L., Zheng, J.Q., 2016. Actin-based growth cone motility and guidance. *Mol. Cell. Neurosci.* 1–7. doi:10.1016/j.mcn.2017.03.001
- Pan, C., Cai, R., Quacquarelli, F.P., Ghasemigharagoz, A., Loubopoulos, A., Matryba, P., Plesnila, N., Dichgans, M., Hellal, F., Ertürk, A., 2016. Shrinkage-mediated imaging of entire organs and organisms using uDISCO. *Nat. Methods* 13, 859–867. doi:10.1038/nmeth.3964
- Porrero, C., Rubio-Garrido, P., Avendaño, C., Clascá, F., 2010. Mapping of fluorescent protein-expressing neurons and axon pathways in adult and developing Thy1-eYFP-H transgenic mice. *Brain Res.* 1345, 59–72. doi:10.1016/j.brainres.2010.05.061
- Quach, T.T., Duchemin, A.-M., Rogemond, V., Aguera, M., Honnorat, J., Belin, M.-F., Kolattukudy, P.E., 2004. Involvement of collapsin response mediator proteins in the neurite extension induced by neurotrophins in dorsal root ganglion neurons. *Mol. Cell. Neurosci.* 25, 433–443. doi:10.1016/j.mcn.2003.11.006
- Quach, T.T., Glasper, E.R., Devries, a C., Honnorat, J., Kolattukudy, P.E., Duchemin, a M., 2008. Altered prepulse inhibition in mice with dendrite abnormalities of hippocampal neurons. *Mol. Psychiatry* 13, 656–658. doi:10.1038/mp.2008.27
- Quach, T.T., Honnorat, J., Kolattukudy, P.E., Khanna, R., Duchemin, a M., 2015. CRMPs: critical molecules for neurite morphogenesis and neuropsychiatric diseases. *Mol. Psychiatry* 275, 27291–27302. doi:10.1038/mp.2015.77
- Quach, T.T., Massicotte, G., Glasper, E.R., Devries, A.C., Jakeman, L.B., Baudry, M., Duchemin, A.A.-M., Kolattukudy, P.E., Belin, M.-F., Honnorat, J., Glasper, E.R., Devries, A.C., Jakeman, L.B., Baudry, M., Duchemin, A.A.-M., Kolattukudy, P.E., 2008. CRMP3 is required for hippocampal CA1 dendritic organization and plasticity. *FASEB J.* 22, 401–409. doi:10.1096/fj.07-9012com
- Quinn, C.C., Chen, E., Kinjo, T.G., Kelly, G., Bell, A.W., Elliott, R.C., McPherson, P.S., Hockfield, S., 2003. TUC-4b, a novel TUC family variant, regulates neurite outgrowth and associates with vesicles in the growth cone. *J. Neurosci.* 23, 2815–2823.
- Rosslensbroich, V., Dai, L., Baader, S.L., Noegel, A. a, Gieselmann, V., Kappler, J., 2005. Collapsin response mediator protein-4 regulates F-actin bundling. *Exp. Cell Res.* 310, 434–444. doi:10.1016/j.yexcr.2005.08.005
- Rünker, A.E., O’Tuathaigh, C., Dunleavy, M., Morris, D.W., Little, G.E., Corvin, A.P., Gill, M., Henshall, D.C., Waddington, J.L., Mitchell, K.J., 2011. Mutation of Semaphorin-6A disrupts limbic and cortical connectivity and models neurodevelopmental psychopathology. *PLoS One* 6. doi:10.1371/journal.pone.0026488
- Schindelin, J., Arganda-Carreras, I., Frise, E., Kaynig, V., Longair, M., Pietzsch, T., Preibisch, S., Rueden, C., Saalfeld, S., Schmid, B., Tinevez, J.-Y., White, D.J., Hartenstein, V., Eliceiri, K., Tomancak, P., Cardona, A., 2012. Fiji: an open-source platform for biological-image analysis. *Nat. Methods* 9, 676–82. doi:10.1038/nmeth.2019
- Schmued, L., Bowyer, J., Cozart, M., Heard, D., Binienda, Z., Paule, M., 2008. Introducing Black-Gold II, a highly soluble gold phosphate complex with several unique advantages for the histochemical localization of myelin. *Brain Res.* 1229, 210–217. doi:10.1016/j.brainres.2008.06.129
- Su, K., Chien, W., Fu, W., Yu, I., Huang, H., Huang, P., Lin, S., Shih, J., Lin, Y., Hsueh, Y., Yang, P., Lin, S., 2007. Mice Deficient in Collapsin Response Mediator Protein-1 Exhibit Impaired Long-Term Potentiation and Impaired Spatial Learning and Memory 27, 2513–2524. doi:10.1523/JNEUROSCI.4497-06.2007
- Tan, M., Cha, C., Ye, Y., Zhang, J., Li, S., Wu, F., Gong, S., Guo, G., 2015. CRMP4 and CRMP2 interact to coordinate cytoskeleton dynamics, regulating growth cone development and axon elongation. *Neural Plast.* 2015. doi:10.1155/2015/947423
- Tessier-Lavigne, M., Placzek, M., Lumsden, A.G., Dodd, J., Jessell, T.M., 1988. Chemotropic guidance of



- developing axons in the mammalian central nervous system. *Nature* 336, 775–778. doi:10.1038/336775a0
- Tsuboi, D., Hikita, T., Qadota, H., Amano, M., Kaibuchi, K., 2005. Regulatory machinery of UNC-33 C-  
CRMP localization in neurites during neuronal development in *Caenorhabditis elegans*. *J. Neurochem.* 95,  
1629–1641. doi:10.1111/j.1471-4159.2005.03490.x
- Tsutiya, A., Nishihara, M., Goshima, Y., Ohtani-Kaneko, R., 2015. Mouse pups lacking collapsin response  
mediator protein 4 (CRMP4) manifest impaired olfactory function and hyperactivity in the olfactory bulb.  
*Eur. J. Neurosci.* n/a--n/a. doi:10.1111/ejn.12999
- Tsutiya, A., Watanabe, H., Nakano, Y., Nishihara, M., Goshima, Y., Ohtani-Kaneko, R., 2016. Deletion of  
collapsin response mediator protein 4 results in abnormal layer thickness and elongation of mitral cell  
apical dendrites in the neonatal olfactory bulb. *J. Anat.* n/a--n/a. doi:10.1111/joa.12434
- Uchida, Y., Ohshima, T., Sasaki, Y., Suzuki, H., Yanai, S., Yamashita, N., Nakamura, F., Takei, K., Ihara, Y.,  
Mikoshihara, K., Kolattukudy, P., Honnorat, J., Goshima, Y., 2005. Semaphorin3A signalling is mediated  
via sequential Cdk5 and GSK3B phosphorylation of CRMP2: Implication of common phosphorylating  
mechanism underlying axon guidance and Alzheimer's disease. *Genes to Cells* 10, 165–179.  
doi:10.1111/j.1365-2443.2005.00827.x
- Uchida, Y., Ohshima, T., Yamashita, N., Ogawara, M., Sasaki, Y., Nakamura, F., Goshima, Y., 2009.  
Semaphorin3A signaling mediated by fyn-dependent tyrosine phosphorylation of collapsin response  
mediator protein 2 at tyrosine 32. *J. Biol. Chem.* 284, 27393–27401. doi:10.1074/jbc.M109.000240
- Wang, L.H., Strittmatter, S.M., 1996. A family of rat CRMP genes is differentially expressed in the nervous  
system. *J. Neurosci.* 16, 6197–6207.
- Witter, M.P., 2006. Connections of the subiculum of the rat: Topography in relation to columnar and laminar  
organization. *Behav. Brain Res.* 174, 251–264. doi:10.1016/j.bbr.2006.06.022
- Yamashita, N., Goshima, Y., 2012. Collapsin response mediator proteins regulate neuronal development and  
plasticity by switching their phosphorylation status. *Mol. Neurobiol.* 45, 234–46. doi:10.1007/s12035-012-  
8242-4
- Yamashita, N., Morita, A., Uchida, Y., Nakamura, F., Usui, H., Ohshima, T., Taniguchi, M., Honnorat, J.,  
Thomasset, N., Takei, K., Takahashi, T., Kolattukudy, P., Goshima, Y., 2007. Regulation of Spine  
Development by Semaphorin3A through Cyclin-Dependent Kinase 5 Phosphorylation of Collapsin  
Response Mediator Protein 1. *J. Neurosci.* 27, 12546–12554. doi:10.1523/JNEUROSCI.3463-07.2007
- Yamashita, N., Ohshima, T., Nakamura, F., Kolattukudy, P., Honnorat, J., Mikoshihara, K., Goshima, Y., 2012.  
Phosphorylation of CRMP2 (collapsin response mediator protein 2) is involved in proper dendritic field  
organization. *J. Neurosci.* 32, 1360–1365. doi:10.1523/JNEUROSCI.5563-11.2012
- Yamashita, N., Takahashi, A., Takao, K., Yamamoto, T., Kolattukudy, P., Miyakawa, T., Goshima, Y., 2013.  
Mice lacking collapsin response mediator protein 1 manifest hyperactivity, impaired learning and memory,  
and impaired prepulse inhibition. *Front. Behav. Neurosci.* 7, 1–10. doi:10.3389/fnbeh.2013.00216
- Yoshimura, T., Kawano, Y., Arimura, N., Kawabata, S., Kikuchi, A., Kaibuchi, K., 2005. GSK-3  $\square$  Regulates  
Phosphorylation of CRMP-2 and Neuronal Polarity. *Cell* 120, 137–149. doi:10.1016/j.cell.2004.11.012
- Yukawa, K., Tanaka, T., Bai, T., Ueyama, T., Owada-akabe, K., Tsubota, Y., Maeda, M., Suzuki, K., Kikutani,  
H., Kumanogoh, A., 2005. Semaphorin 4A induces growth cone collapse of hippocampal neurons in a Rho  
/ Rho-kinase-dependent manner. *Int. J. Mol. Med.* 115–118.



## 10.6 **Résumé de l'article "3D imaging of the brain morphology and connectivity defects in a model of psychiatric disorders: MAP6-KO mice"**

par U Gimenez, **B Boulan**, F Mauconduit, F Taurel, M Leclercq, E Denarier, J Brocard, S Gory-Fauré, A Andrieux, H Lahrech\*, J.C Deloulme\*

**Scientific Reports 2017** Sep 4;7(1):10308. DOI: 10.1038/s41598-017-10544-2.

L'imagerie DTI est basée sur la détection des molécules d'eau lorsque l'on applique un champ magnétique sur un tissu. Cette détection est permise par la sensibilité des atomes d'hydrogène, qui composent les molécules d'eau, à ce champ magnétique. De cette manière, il est possible de calculer localement le coefficient de diffusion des molécules d'eau. Dans un tissu biologique, la diffusion de ces molécules va être restreinte par le milieu qui les entoure. Cette restriction est nommée fraction d'anisotropie (F.A.). Elle correspond à la propension qu'ont les molécules d'eau à se déplacer de façon aléatoire au sein de ce tissu (faible F.A.), ou alors dans une direction déterminée (forte F.A.). Il est admis qu'un ensemble de fibres neuronales myélinisées, constituant principal de la substance blanche, vont avoir tendance à contraindre le déplacement des molécules d'eau dans la même orientation qu'elles et ainsi augmenter localement la F.A. du tissu. A l'inverse pour la matière grise, composée principalement des corps cellulaires des neurones ainsi que d'autres types cellulaires, la F.A. observée sera plus faible. C'est ainsi qu'il est possible d'extrapoler, à partir de la diffusion des molécules d'eau, l'organisation des différentes fibres nerveuses composant le cerveau.

Le but de cette étude a été d'affiner la connaissance des défauts neuro-anatomiques des souris KO MAP6 par l'analyse approfondie de l'imagerie IRM de leur cerveau. Pour cela de nouvelles techniques d'IRM ont été utilisées permettant d'améliorer la résolution spatiale en 3D des acquisitions. Une résolution isotropique de 60µm en IRM-3D et 80µm en DTI-3D (Diffusion Tensor Imaging 3D) a ainsi pu être atteinte dans cette étude.

A travers l'analyse structurale en IRM-3D, les hypoplasies déjà identifiées (cortex, thalamus, bulbe olfactif...) ont tout d'abord été confirmées. Puis de nouvelles ont pu être révélées (caudate putamen, colliculi...). En revanche, on remarque que certaines structures comme la formation hippocampale ou le globus pallidus ne sont absolument pas affectés par l'absence de MAP6 (Figure 1).

Sachant que l'hypoplasie cérébrale des souris KO MAP est principalement due à une diminution des volumes de substance blanche, l'intégrité des connectivités a été étudiée par mesure DTI-3D. En accord avec les observations précédentes (Deloulme et al., 2015), l'absence de la post-commissure du fornix a de nouveau pu être mesurée en DTI. En comparant ces acquisitions DTI-3D avec l'observation, plus directe, de ce faisceau dans des cerveaux rendus transparents, nous avons pu apprécier la fiabilité et la précision de ces mesures (Figure 2).

Différentes altérations de faisceaux neuronaux ont été mesurées, à la fois sur la base de leur volume de fibres ainsi que sur leur orientation spatiale au sein du cerveau, paramètre difficilement accessible en histologie (Figure 3 et 4). Cette analyse a permis la détection de différentes altérations jusqu'ici passées inaperçues. Tout d'abord, on observe chez les souris KO MAP6, que le fasciculus retroflexus ainsi que le tract mamillo-thalamic apparaissent mal orientés avec un angle décalé, par rapport à la normale, de 12 et 15° respectivement. Un autre défaut majeur a pu être mis en évidence, celui-ci consiste en une rupture du signal DTI du faisceau pyramidal au niveau du noyau pontique (Figure 5). Ce faisceau fait partie d'un ensemble de fibres formant le tractus corticaux-spinal. Il est constitué de projections axonales de neurones de la couche V corticale, qui vont traverser la capsule interne (ic) et le pédoncule cérébral (cp) avant d'aller connecter la moelle épinière. Nous avons tiré avantage de l'expression endogène de la YFP (Yellow Fluorescent Protein) par les neurones de la couche V corticale chez la lignée H de souris Thy1, que nous avons croisée avec les souris KO MAP6 afin d'observer directement l'état du faisceau pyramidal en l'absence de MAP6. De nouveau, l'analyse histologique des cerveaux de ces souris a permis d'étayer cette observation découverte en DTI-3D. Nous avons déterminé qu'une forte défasciculation du faisceau pyramidal au niveau du noyau pontique est à l'origine de cette rupture apparente du signal DTI-3D (Figure 6). Associée à cette défasciculation locale, nous avons observé une diminution de la surface de section de ce faisceau tout au long de son trajet.

Nous avons tenté de montrer à travers cette étude l'utilité de l'IRM pour l'investigation d'altérations neuro-anatomiques. En dépit de la faible résolution de cette technique en comparaison à l'histologie (80  $\mu\text{m}$  en DTI-3D contre 1,6 à 6,5 $\mu\text{m}$  en microscopie à fluorescence dans cette étude), elle est suffisante pour la détection et l'observation de défauts subtils. Ces observations permettent alors de faciliter le travail d'analyse histologique en ciblant les régions d'intérêt. Une observation plus précise permet alors de mieux détailler l'altération détectée. Ma participation dans cette étude correspond à la réalisation de l'ensemble de l'analyse histologique ayant permis la confirmation ou l'approfondissement des observations IRM.

10.7 **Article 3** : "3D imaging of the brain morphology and connectivity defects in a model of psychiatric disorders: MAP6-KO mice"

# SCIENTIFIC REPORTS



OPEN

## 3D imaging of the brain morphology and connectivity defects in a model of psychiatric disorders: MAP6-KO mice

Ulysse Gimenez<sup>1,2</sup>, Benoit Boulan<sup>2,3</sup>, Franck Mauconduit<sup>1,2</sup>, Fanny Taurel<sup>1,2</sup>, Maxime Leclercq<sup>1,2</sup>, Eric Denarier<sup>2,3,4</sup>, Jacques Brocard<sup>2,3</sup>, Sylvie Gory-Fauré<sup>2,3</sup>, Annie Andrieux<sup>2,3,4</sup>, Hana Lahrech<sup>1,2</sup> & Jean Christophe Deloulme<sup>2,3</sup>

In the central nervous system, microtubule-associated protein 6 (MAP6) is expressed at high levels and is crucial for cognitive abilities. The large spectrum of social and cognitive impairments observed in MAP6-KO mice are reminiscent of the symptoms observed in psychiatric diseases, such as schizophrenia, and respond positively to long-term treatment with antipsychotics. MAP6-KO mice have therefore been proposed to be a useful animal model for these diseases. Here, we explored the brain anatomy in MAP6-KO mice using high spatial resolution 3D MRI, including a volumetric  $T_{1w}$  method to image brain structures, and Diffusion Tensor Imaging (DTI) for white matter fiber tractography. 3D DTI imaging of neuronal tracts was validated by comparing results to optical images of cleared brains. Changes to brain architecture included reduced volume of the cerebellum and the thalamus and altered size, integrity and spatial orientation of some neuronal tracks such as the anterior commissure, the mammillary tract, the corpus callosum, the corticospinal tract, the fasciculus retroflexus and the fornix. Our results provide information on the neuroanatomical defects behind the neurological phenotype displayed in the MAP6-KO mice model and especially highlight a severe damage of the corticospinal tract with defasciculation at the location of the pontine nuclei.

Microtubule effectors regulate microtubule organization and play key roles during brain development. In neurons, microtubule effectors contribute to a variety of neuronal functions involved in brain wiring such as migration and neuronal polarization, elongation and axonal guidance<sup>1</sup>. Mutations of genes encoding microtubule effectors including Microtubule-Associated Proteins (MAPs) such as Disrupted-In Schizophrenia1 (DISC-1), the lissencephaly protein and doublecortin, cause dysfunctional neuronal connectivity and a variety of structural brain abnormalities<sup>2,3</sup>. These mutations lead to a large spectrum of neurological and psychiatric disorders, including schizophrenia, bipolarity, lissencephaly, double cortex syndrome or microcephaly<sup>4-8</sup>. In accordance with the involvement of MAPs in brain disorders, when microtubule-associated protein 6 is deleted in mice (MAP6-KO), severe behavioral disorders are observed, such as locomotor hyperactivity, severe social withdrawal, and cognitive deficits<sup>9-14</sup>. These animals also exhibit abnormalities in glutamatergic and dopaminergic neurotransmission, deficits associated with neuronal and synaptic plasticity and impaired sensorimotor gating<sup>10,13,15-18</sup>. Altogether, these effects are reminiscent of the clinical features observed in psychiatric diseases, in particular schizophrenia for the cognitive defects. Interestingly, some of the behavioral and biological defects of MAP6-KO can be partially alleviated by long-term treatment with neuroleptics or antidepressants<sup>9,13,19,20</sup>. The MAP6-KO is therefore a relevant model for the study of schizophrenia.

In our previous study, and in studies by other groups, some changes to brain anatomy and connectivity were described in MAP6-KO mice, such as a reduced brain volume, depleted serotonergic axonal projections, severe

<sup>1</sup>INSERM, U1205, BrainTech Lab, F-38000, Grenoble, France. <sup>2</sup>Univ. Grenoble Alpes, F-38000, Grenoble, France.

<sup>3</sup>INSERM, U1216, Grenoble Institut des Neurosciences, F-38000, Grenoble, France. <sup>4</sup>Commissariat à l'Énergie Atomique, BIG-GPC, F-38000, Grenoble, France. Ulysse Gimenez and Benoit Boulan contributed equally to this work. Hana Lahrech and Jean Christophe Deloulme jointly supervised this work. Correspondence and requests for materials should be addressed to H.L. (email: [hana.lahrech@univ-grenoble-alpes.fr](mailto:hana.lahrech@univ-grenoble-alpes.fr)) or J.C.D. (email: [jean-christophe.deloulme@univ-grenoble-alpes.fr](mailto:jean-christophe.deloulme@univ-grenoble-alpes.fr))

hypoplasia of long-distance projecting axon tracts, and an absence of the post-commissural fornix<sup>14,17,21</sup>. These characteristics strongly suggest that MAP6 plays a major role in brain anatomy and white matter tract connectivity. The goal of this study was to characterize the changes to brain anatomy in MAP6-KO animals using 3D neuroimaging techniques including Magnetic Resonance Imaging (MRI) and fluorescence microscopy on cleared brains. Images were acquired at high spatial resolution to allow detection and differentiation of neuronal tracts and brain regions in the small mouse brain. The 3D Diffusion Tensor Imaging (DTI) tractography of mouse white matter was validated by confirming results using fluorescence microscopy on cleared brains. The results revealed the basis of the neuroanatomical defects in MAP6-KO mice, in particular in the corticospinal tract, which connects the subset of layer V cortical neurons to motor neurons and interneurons in the spinal cord.

## Results

**MAP6 deletion affects brain anatomy.** All the results given here are discussed as comparisons between results from MAP6-KO and wild type (WT) mice. Figure 1A shows a macroscopic analysis of the apparent brain surface. Surface quantifications for brain structures in WT and MAP6-KO were compared on dorsal macroscopic views. Significant disparities were observed between brain surface areas for MAP6-KO to WT. Thus, in MAP6-KO animals, the apparent surface of the whole brain was decreased ( $-7.9 \pm 1.9\%$ ,  $p = 0.0040$ ), as were those of the cortex (CX,  $-3.6 \pm 1.8\%$ ,  $p = 0.0093$ ), the olfactory bulbs (OB,  $-6.9 \pm 3.8\%$ ,  $p = 0.0059$ ) and the cerebellum (CB,  $-32.9 \pm 2.6\%$ ,  $p = 0.0040$ ). In contrast, the surface areas of the superior and inferior colliculi regions were increased (CO,  $+43.5 \pm 6.0\%$ ,  $p = 0.0040$ ).

Figure 1B shows brain structure segmentation and their corresponding volume quantifications, as determined from 3D T<sub>1W</sub> MRI data. The overall brain volume was decreased by  $15.6 \pm 1.7\%$  (Total,  $p = 0.0079$ ) but the decrease was not uniform. Thus, a marked decrease in volume was noted for the cerebellum (CB,  $-31.7 \pm 3.2\%$ ,  $p = 0.0079$ ) and the thalamus (TH,  $-30.4 \pm 4.2\%$ ,  $p = 0.0079$ ), whereas the reduction was less substantial for the cortex (CX,  $-12.0 \pm 3.2\%$ ,  $p = 0.0079$ ), the striatum (CPU,  $-14.6 \pm 4.7\%$ ,  $p = 0.0079$ ), the hypothalamus (HP,  $-18.6 \pm 2.3\%$ ,  $p = 0.0079$ ) and the olfactory bulbs (OB,  $-13.2 \pm 3.3\%$ ,  $p = 0.0079$ ). The volume of the colliculi (CO,  $-8.1 \pm 5.6\%$ ,  $p = 0.0556$ ), the globus pallidus (GP,  $p = 0.3095$ ) and the hippocampal formation (HF,  $p = 1.0000$ ) were unchanged by lack of MAP6. Altogether, these results show a clear reduction in total brain volume in MAP6-KO mice, which is associated with heterogeneous anatomical changes. A drastically reduced volume was measured in the cerebellar and thalamic regions, while hippocampal formation was unaltered.

**3D DTI and fluorescence microscopy on cleared brains.** Figure 2 shows the fornix tract reconstructed from DTI data compared to the tract defined by fluorescence microscopy on cleared brains. Figure 2A presents the fornix system, which is a major output of the hippocampal formation, schematized in normal brain. This complex neuronal tract is composed of three major efferent tracts: the pre-commissural fornix (pre-f) which is rostral to the anterior commissure (ac) and projects into septal regions (SPT); and the post-commissural fornix (post-f) which passes behind the anterior commissure, innervates the anterior hypothalamus (AH) through the medial-corticohypothalamic tract (mcht) and terminates at the posterior hypothalamus in the mammillary body (MB)<sup>22–26</sup>.

To reconstruct the fornix tract from DTI data, a restricting ROI was drawn around the fimbria-fornix (Fig. 2B, coronal plane, red ROI, Bregma: 0.02 mm; also see supplemental Table 1). Two excluding ROIs were also used to avoid contamination of the trace with nerve fibers from the anterior commissure. These ROIs were placed on the anterior commissure, on the mid-sagittal plane (Fig. 2B, sagittal plane, green ROI, lateral  $-0.4$  mm) and on the coronal plane (Fig. 2B, coronal plane, green ROI, Bregma: 0.14 mm).

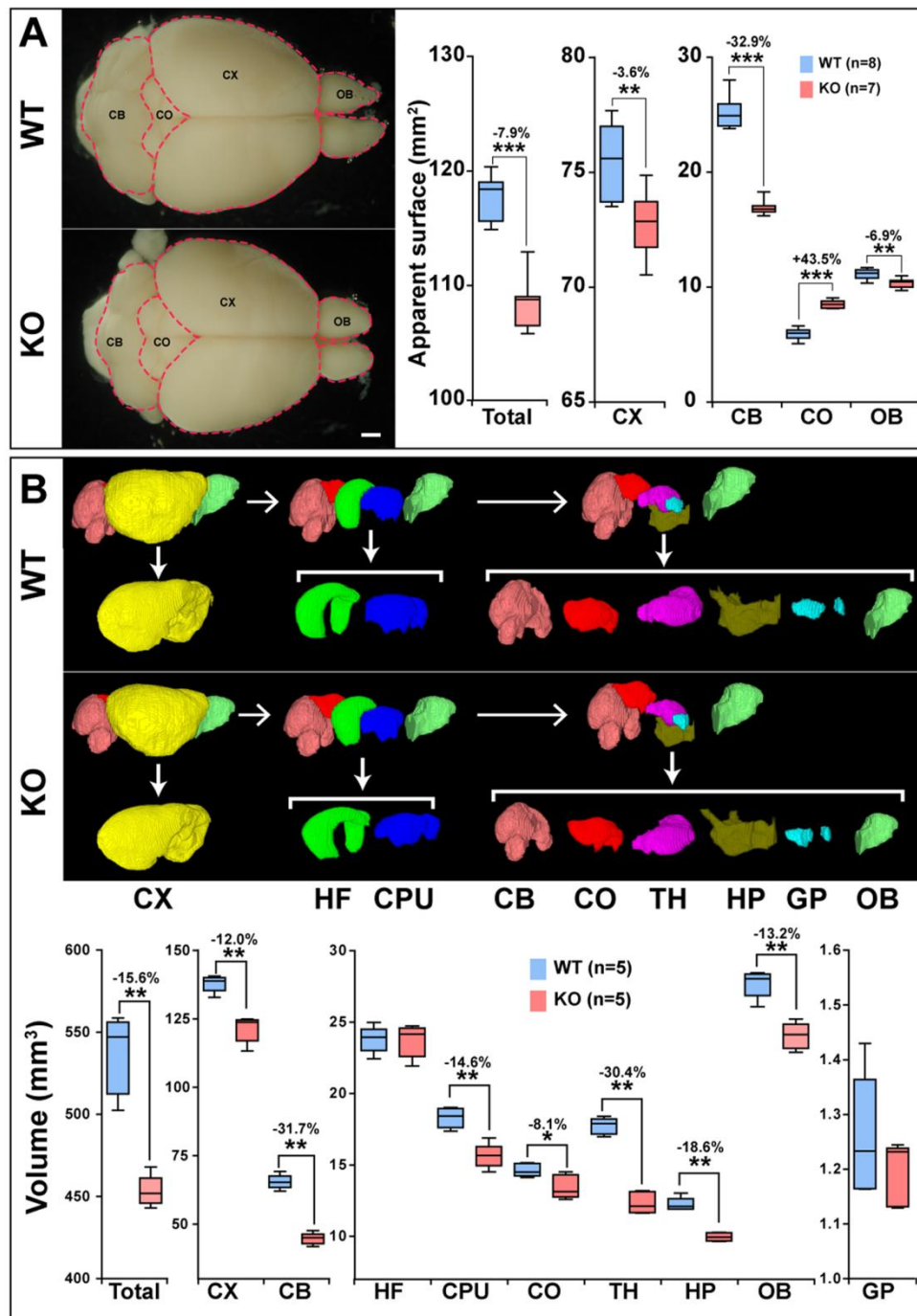
The comparison of reconstructions of the fornix system derived from DTI tractography and fluorescence microscopy data on cleared brains (Fig. 2C) show that tract reconstructions in WT and MAP6-KO mice were similar with the two techniques excepted for the medial-corticohypothalamic tract (mcht), which projects toward the anterior hypothalamus, and misrouted fibers cannot be visualized by DTI tractography (Fig. 2C, Movie 1).

**Heterogeneous alterations to neuronal tracts.** Figures 3 and 4 summarize the tract sizes determined for various brain structures. The volume of white matter, as visualized in whole-brain DTI tractography, was reduced by  $33 \pm 6.5\%$  ( $p = 0.0002$ ) (Fig. 3A); a similar tendency was observed for the internal capsule (ic,  $-39 \pm 9\%$ ,  $p = 0.0002$ ), the fornix (f,  $-32 \pm 8\%$ ,  $p = 0.0002$ ), the intrabulbar anterior commissure (aci,  $-38 \pm 16\%$ ,  $p = 0.0009$ ) and the cerebral peduncle (cp,  $-32 \pm 6\%$ ,  $p = 0.0002$ ) (Fig. 3A). The reduction was pronounced for the optical tract (opt,  $-44 \pm 10\%$ ,  $p = 0.0009$ ), the mammillary tract (mt,  $-49 \pm 18\%$ ,  $p = 0.0006$ ), the anterior commissures (ac,  $-54 \pm 5\%$ ,  $p = 0.0002$ ), the stria medularis (sm,  $-53 \pm 6\%$ ,  $p = 0.0002$ ) and the corpus callosum (cc,  $-44 \pm 5\%$ ,  $p = 0.0002$ ). The size of the fasciculus retroflexus and the stria terminalis was also reduced, but the difference was not significant for the fasciculus retroflexus (fr,  $-19 \pm 18\%$ ,  $p = 0.0650$ ) and st,  $-28 \pm 15\%$ ,  $p = 0.0047$ ). Interestingly within the anterior commissure, we observed differences between the anterior part of the anterior commissure (aca,  $-39 \pm 10\%$ ,  $p = 0.0009$ ) and the posterior part of the anterior commissure (acp,  $-70 \pm 11\%$ ,  $p = 0.0009$ ).

For several key tracts we report the volume, their fiber number and length (Table 1). For all these tracts, the volume was reduced mainly because of a reduced number of fibers, but also due to shorter tracts. These two geometrical alterations (number and length of fibers) caused the connections between brains areas to form incompletely, an effect which might underline the severe behavioral disorders observed in MAP6-KO mice. Furthermore, in regions where fibers remained, the mean ADC<sub>perpendicular</sub> value, which gives an indication of the water diffusion anisotropy, remained unchanged. This result indicates that, even when several key tracts are drastically damaged, the integrity of myelin fiber is not affected.

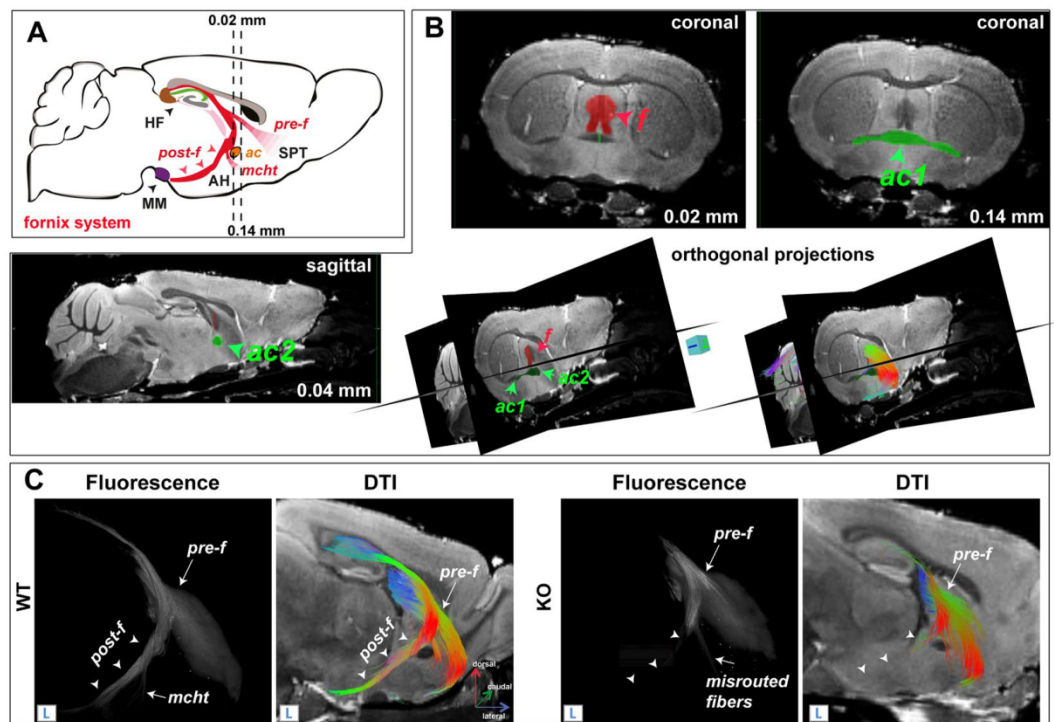
Representative reconstructions of each neuronal tract illustrating specific alterations are shown in Figs 3B and 4. In these images, the anterior commissure appeared much thinner (Fig. 3B, ac, arrow) and the rectilinear





**Figure 1.** Morphological macroscopic defects associated with MAP6 deletion. **(A)** WT and MAP6-KO brains photographed on dorsal views; apparent brain area was manually delimited (red line). Scale bar: 1 mm. The box-and-whisker plots show the apparent brain area for different regions in mm<sup>2</sup>. Significant percent changes (decrease or increase) are indicated by asterisks. **(B)** 3D reconstructions of brain areas were built from high spatial resolution MRI-T<sub>1w</sub> data. Each brain structure is represented with a specific color: cortex (CX, yellow); hippocampal formation (HF, dark green); caudate putamen (CPU, dark blue); cerebellum (CB, pink); colliculi (CO, red); thalamus (TH, purple); hypothalamus (HP, khaki); globus pallidus (GP, light blue); olfactory bulbs (OB, light green). The box-whisker plots show volumes for these regions (in mm<sup>3</sup>). Percent volume reduction in MAP6-KO mice is indicated. Black bars represent the median, boxes represent the 25<sup>th</sup> and 75<sup>th</sup> percentiles, and the whiskers represent the 5<sup>th</sup> and 95<sup>th</sup> percentiles (\*\**p* < 0.01; \*\*\**p* < 0.001, Mann-Whitney test).

portion of the fasciculus retroflexus was shorter ( $-24 \pm 6\%$ ,  $p = 0.0002$ ) and its dorso-ventral position was shifted, as indicated by a significant change in angle of  $+12 \pm 5^\circ$  (Fig. 3B, fr,  $\alpha$ ,  $p = 0.0002$ ). In the figures, these alterations are reflected by color changes from red to orange (Fig. 3B, fr). Similarly, deviation of the angle of the mammillary



**Figure 2.** Fornix tract reconstruction from DTI- and fluorescence microscopy on cleared brains. (A) Schematic representation of the fornix tract (red region) on a sagittal diagram. Dashed lines indicate the Bregma position, in mm of the coronal planes. HF: hippocampal formation; MM: mammillary body; AH: anterior hypothalamus; SPT: septum; pre-f: pre-commissural fornix; post-f: post-commissural fornix; mcht, medial-cortico-hypothalamic tract and ac: anterior commissure. (B) The tractography of the fornix tract is shown on reference diffusion images. The tract was reconstructed using a restricting ROI (coronal, red, f) over the fimbria-fornix and two excluding ROIs (green) drawn on the coronal (coronal, green, ac1) and mid-sagittal (sagittal, green, ac2) planes, over the anterior commissure. (C) 3D-DTI tractography of the fornix compared to data acquired by fluorescence microscopy on cleared brain. The two imaging modalities show similar results and detect the absence of the post-commissural fornix in MAP6-KO mice (arrowheads). These results validate our 3D DTI method for WM tractography.

tract increased significantly (Fig. 3B, mt,  $\alpha$ ,  $+15 \pm 4^\circ$ ,  $p = 0.0011$ ) without any change to its length ( $p = 0.9163$ ). For these specific tracts, changes in spatial position were clearly visible. Finally, severely decreased posterior projections of the internal capsule (Fig. 3B, ic, white arrow) and of the cerebral peduncle (Fig. 4, cp, white arrow) were detected. These projections are part of the pyramidal tract, which itself contributes to the corticospinal tract.

**Alterations to the corticospinal tract.** In WT, and as normally described, the corticospinal tract could be accurately visualized by DTI (Fig. 5A,B, cp and ic respectively). The reconstructed fibers projected through the internal capsule (ic) and the cerebral peduncle (cp) toward the brainstem via the pyramidal tract (py) to terminate in the spinal cord. At the boundary between the medulla and the spinal cord, the pyramidal tract turns in the dorsal direction and crosses the midline to form the pyramidal decussation (pyx) (see also diagram in Fig. 6A).

In WT mice, the pyramidal projections were visible (Fig. 5A and Fig. 5B, red arrow). Different restricting ROIs were used, one from the cerebral peduncle (Fig. 5A) and the second from the internal capsule (Fig. 5B). In MAP6-KO brains, the pyramidal projection was clearly lost, as evidenced by a breaking point at the level of the structure containing the pontine nuclei (Fig. 5A,B, Pn, yellow arrow).

Similarly, in MAP6-KO, when reconstructing the corticospinal tract from the pyramidal tract (Fig. 5C, py), we also detected a breaking point at the pontine nucleus (Fig. 5C, Pn, yellow arrow). Taken together, information provided by tractography reconstructions indicated that several corticospinal projections are disrupted at the level of the pontine nucleus in MAP6-KO mice.

The full corticospinal tract was visualized in Thy-eYFP-H mice by fluorescence microscopy (Fig. 6). This visualization was possible since this tract is mostly composed of axonal projections of cortical neurons from layer V that specifically express eYFP in this model (Fig. 6A)<sup>27</sup>. Coronal sections were used to compare the general structure of the corticospinal tract between WT and MAP6-KO mice. We initially observed that the area of the internal capsule (Fig. 6B) and of the cerebral peduncle (Fig. 6C) were decreased by  $40 \pm 22\%$  and  $35 \pm 6\%$ , respectively (Fig. 6F, ic,  $p = 0.0286$  and cp,  $p = 0.0286$ ); subsequently, we noted a severe defasciculation of the anterior part of the pyramidal tract at the level of the pontine nuclei (Fig. 6D, red arrows). In WT mice, the pyramidal tract forms a compact triangle; which is not the case in MAP6-KO (see red arrows, Fig. 6D). We further examined the posterior part of the pyramidal tract that was reduced by  $43 \pm 16\%$  (Fig. 6E,F,  $p = 0.0286$ ). The examination of the

| neuronal tracts                       | Volume (mm <sup>3</sup> ) |                | Number of fibers |                | Mean length (mm) |               | Mean ADC <sub>⊥</sub> |             |
|---------------------------------------|---------------------------|----------------|------------------|----------------|------------------|---------------|-----------------------|-------------|
|                                       | WT                        | KO             | WT               | KO             | WT               | KO            | WT                    | KO          |
| anterior commissure (ac)              | 3.3 ± 0.5                 | 1.5 ± 0.2***   | 1285 ± 207       | 673 ± 90***    | 5.6 ± 0.5        | 4.6 ± 0.4**   | 0.44 ± 0.03           | 0.41 ± 0.04 |
| intrabulbar anterior commissure (aci) | 3.8 ± 0.3                 | 2.3 ± 0.6***   | 1420 ± 200       | 1157 ± 432**   | 3.3 ± 0.4        | 2.6 ± 0.3***  | 0.49 ± 0.03           | 0.47 ± 0.05 |
| corpus callosum (cc)                  | 27.4 ± 1.0                | 15.5 ± 1.5***  | 15423 ± 1355     | 7561 ± 1099*** | 6.6 ± 0.8        | 5.4 ± 0.3*    | 0.42 ± 0.02           | 0.42 ± 0.03 |
| cerebral peduncle (cp)                | 16.1 ± 1.7                | 11.1 ± 0.9***  | 7693 ± 656       | 5642 ± 493***  | 4.2 ± 0.3        | 3.4 ± 0.1***  | 0.43 ± 0.02           | 0.42 ± 0.02 |
| fornix system (f)                     | 15.4 ± 12.0               | 10.5 ± 1.3***  | 5120 ± 982       | 3646 ± 857*    | 6.7 ± 0.5        | 6.0 ± 0.4*    | 0.40 ± 0.02           | 0.40 ± 0.03 |
| fasciculus retroflexus (fr)           | 0.98 ± 0.19               | 0.79 ± 0.23    | 393 ± 58         | 293 ± 46**     | 2.3 ± 0.1        | 2.1 ± 0.3     | 0.44 ± 0.02           | 0.43 ± 0.03 |
| internal capsule (ic)                 | 20.8 ± 1.9                | 12.7 ± 1.9***  | 9997 ± 1546      | 5991 ± 1182*** | 3.8 ± 0.3        | 3.1 ± 0.1***  | 0.43 ± 0.02           | 0.42 ± 0.03 |
| mammillary tract (mt)                 | 0.91 ± 0.20               | 0.46 ± 0.2***  | 243 ± 54         | 123 ± 35***    | 1.9 ± 0.2        | 1.7 ± 0.3     | 0.45 ± 0.01           | 0.44 ± 0.04 |
| optic tract (opt)                     | 6.9 ± 1                   | 3.9 ± 0.7***   | 2453 ± 407       | 1315 ± 301***  | 5.4 ± 0.5        | 4.4 ± 0.3**   | 0.49 ± 0.02           | 0.45 ± 0.03 |
| pyramidal tract (py)                  | 6.1 ± 1.6                 | 3.0 ± 0.8***   | 1546 ± 473       | 1014 ± 304*    | 3.8 ± 0.5        | 3.1 ± 0.4*    | 0.44 ± 0.01           | 0.39 ± 0.09 |
| stria medularis (sm)                  | 1.53 ± 0.32               | 0.72 ± 0.09*** | 554 ± 61         | 330 ± 53***    | 2.6 ± 0.3        | 1.9 ± 0.19*** | 0.40 ± 0.03           | 0.41 ± 0.04 |
| stria terminalis (st)                 | 2.7 ± 0.5                 | 2.0 ± 0.4**    | 682 ± 162        | 508 ± 126*     | 3.7 ± 0.7        | 3.3 ± 0.5     | 0.40 ± 0.02           | 0.39 ± 0.03 |

**Table 1.** Perpendicular ADC (ADC<sub>⊥</sub>) and geometric parameters for some key tracts (n = 8 WT and n = 8 KO mice; \**p* < 0.05, \*\**p* < 0.01, \*\*\**p* < 0.001; Mann-Whitney test).

general appearance of the pyramidal tract on whole-mount brainstem (Fig. 6G) and sagittal sections (Fig. 6H) confirmed this atrophy. In MAP6-KO mice, the pyramidal tract was significantly thinner and the interstitial space of the posterior pyramidal tract was much broader than in WT animals (+67%, *p* = 0.0011) (Fig. 6G, d).

Altogether, data from DTI tractography and fluorescence microscopy indicated a severe restriction of the corticospinal tract with evidence of defasciculation at the location of the pontine nuclei.

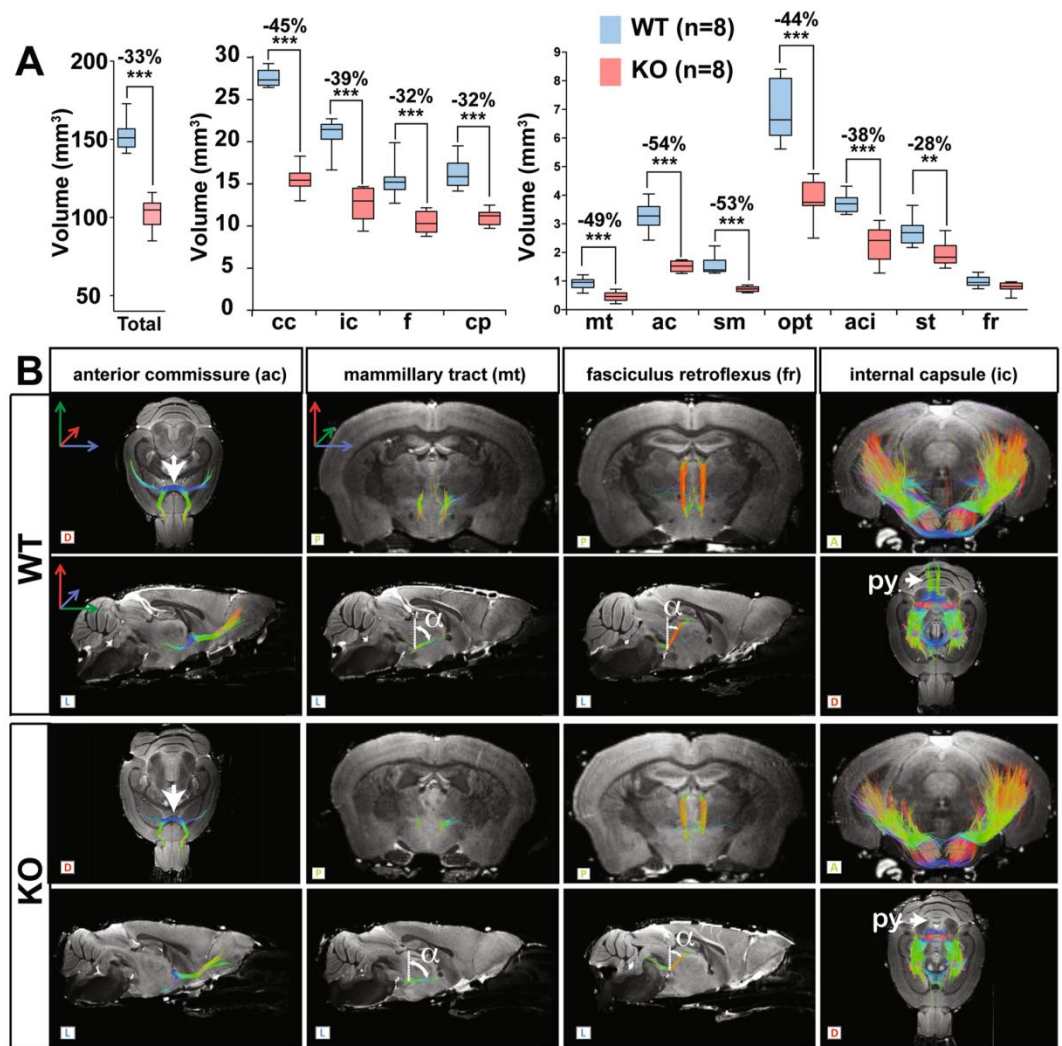
## Discussion

In this article we used 3D-MRI imaging techniques to characterize the anatomical defects present in MAP6-KO mouse brains. Our results show that 3D DTI tractography can contribute to our understanding and assist with investigations into the structural connectivity of the neuronal tracts in rodents, primates and humans for basic, translational and clinical research purposes<sup>28,29</sup>. In mouse models, the very small brain volume is a real limitation to achieving high spatial resolution in a reasonable time-frame as the signal-to-noise ratio achievable for a single image voxel tends to be low. For the purposes of this study, DTI was performed *ex vivo* using exogenous gadolinium-based MRI contrast agents<sup>30,31</sup> to reduce the relaxation times, in particular the longitudinal value *T*<sub>1</sub>. In these conditions, acquisition time was accelerated, and a high isotropic spatial resolution (80 μm) was attained with a signal-to-noise ratio of 104. For this imaging, diffusion gradients were used in only six spatial directions. This scheme was preferred to HARDI (High Angular Resolution Diffusion Imaging) acquisition, which uses higher numbers of spatial gradient diffusion directions, since in preliminary studies comparing the two methods white matter reconstructions were similar with the same total acquisition time (data not shown). To note separate cohorts of mice were used for volumetric and DTI acquisitions due to the design of the protocol and the availability of magnets; each set of experiments giving significant differences between WT and MAP6-KO animals.

One of the major results of our study is the validation of the 3D DTI tractography by the fluorescence microscopy on cleared brains. Comparison of reconstructions of the fornix system derived from DTI tractography and fluorescence microscopy data on cleared brains (Fig. 2C) showed that tract reconstructions in WT and MAP6-KO mice were similar with the two techniques excepted for the medial-corticothalamic tract (mcht). This may be related to the lower spatial resolution of DTI compared to optical microscopy (80 μm versus 1.66 μm).

One of the major findings of this study related to the general appearance of the whole brain observed by macroscopic analysis of the apparent surface area in MAP6-KO mice and the marked reductions in volume of the thalamus, the cerebellum and the cerebral cortex. In contrast, the hippocampus was not affected. These results are consistent despite the relatively small number of animals analyzed, since the SD and *p* values were small, indicating a high penetrance of phenotypic changes in MAP6-KO mice. The severely decreased volumes of the cerebellum, the thalamus and the cortex probably cause the new brain organization observed MAP6-KO mice. This new organization affects the apparent surfaces of the colliculi (Fig. 1A) as well as the spatial position of the mammillary and retroflexus tracts (Fig. 3B). Regarding the colliculi, in MAP6-KO mice, we observe a major difference



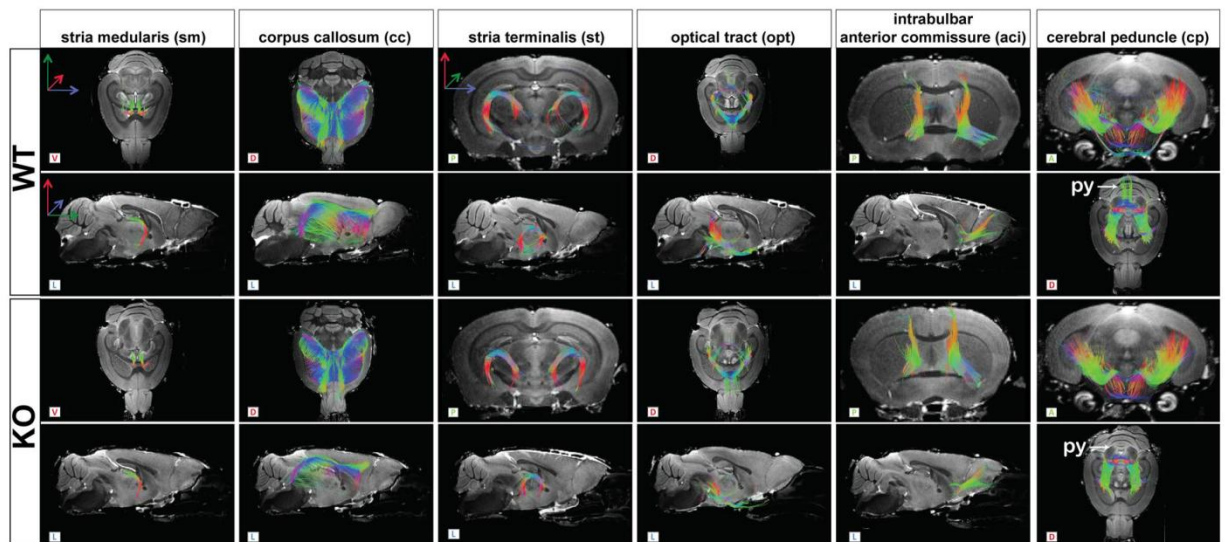


**Figure 3.** DTI tractography shows heterogeneous alterations neuronal tracts in MAP6-KO mice. (A) Neuronal tract volumes. Volume reductions in MAP6-KO mice are indicated in percent when significant. Black bars represent the median, boxes represent the 25<sup>th</sup> and 75<sup>th</sup> percentiles, and whiskers represent the 5<sup>th</sup> and 95<sup>th</sup> percentiles (\*\* $p < 0.01$ ; \*\*\* $p < 0.001$ , Mann-Whitney test). (B) 3D DTI tractography reconstructions of reference diffusion images. The letters L (lateral), D (dorsal), V (ventral), P (posterior) and A (anterior) indicate the viewing position on the display screen. The anterior commissure (ac), the mammillary tract (mt), the fasciculus retroflexus (fr) and the internal capsule (ic) are indicated. The ac was thinner in MAP6-KO brains than in WT brains (arrows). The mt and the fr exhibit structural modifications with a modified inclination angle ( $\alpha$ ). In MAP6-KO mice, the pyramidal projections were dramatically reduced (arrow, py).

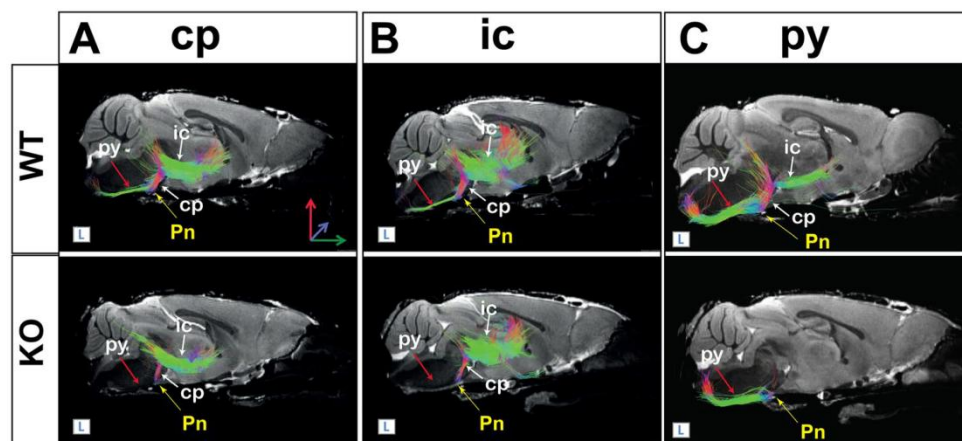
between the small reduction of their volumes and the strong enlargement of their apparent surfaces. This difference results from the combined reduction of cerebellum and cortex uncovering the colliculi and thereby changing their external surface appearance. Overall there was no obvious changes in colliculi shape (Fig. 1B). Altogether, these results indicate that the overall reduction in brain volume is not uniform, and that it affects specific brain structures to different extents. A recent study comparing wild and domestic chickens showed that changes to the volumes of brain regions evolve independently<sup>32</sup>, in accordance with the “mosaic evolution” hypothesis<sup>33</sup>. Indeed, Barton *et al.* identified several loci responsible for the heterogeneous variations in mass reported during the chicken domestication, and MAP6 was shown to be related to the locus controlling cerebellum mass; an observation which is in line with our findings.

It is quite surprising that the hippocampal formation volume is not affected in MAP6 null animal (this study and ref. 14) despite a strong expression of MAP6 in developing and adult hippocampus<sup>34</sup>. It might be due to some compensation events carried out by MAP6 related proteins such as MAP6-D1 (SL21) known to be expressed during late brain development<sup>35</sup>.

The anatomical changes noticed in MAP6-KO mice may be linked to the behavioral and cognitive impairments previously reported<sup>9–17, 19, 20</sup>. Indeed, defects in the circuitry connecting the thalamus - which plays a key role in information processing - to the cortex and the cerebellum could explain a number of the schizophrenia-like characteristics of MAP6-KO mice<sup>36–39</sup>. In addition, the cerebellum was initially considered to play a role only in



**Figure 4.** 3D DTI tractography reconstructions of several key neuronal tracts. The letters L (lateral), D (dorsal), V (ventral), P (posterior) and A (anterior) indicate the viewing position on the display screen. In the tractography for the cerebral peduncle, the white arrows indicate the pyramidal projections (py).



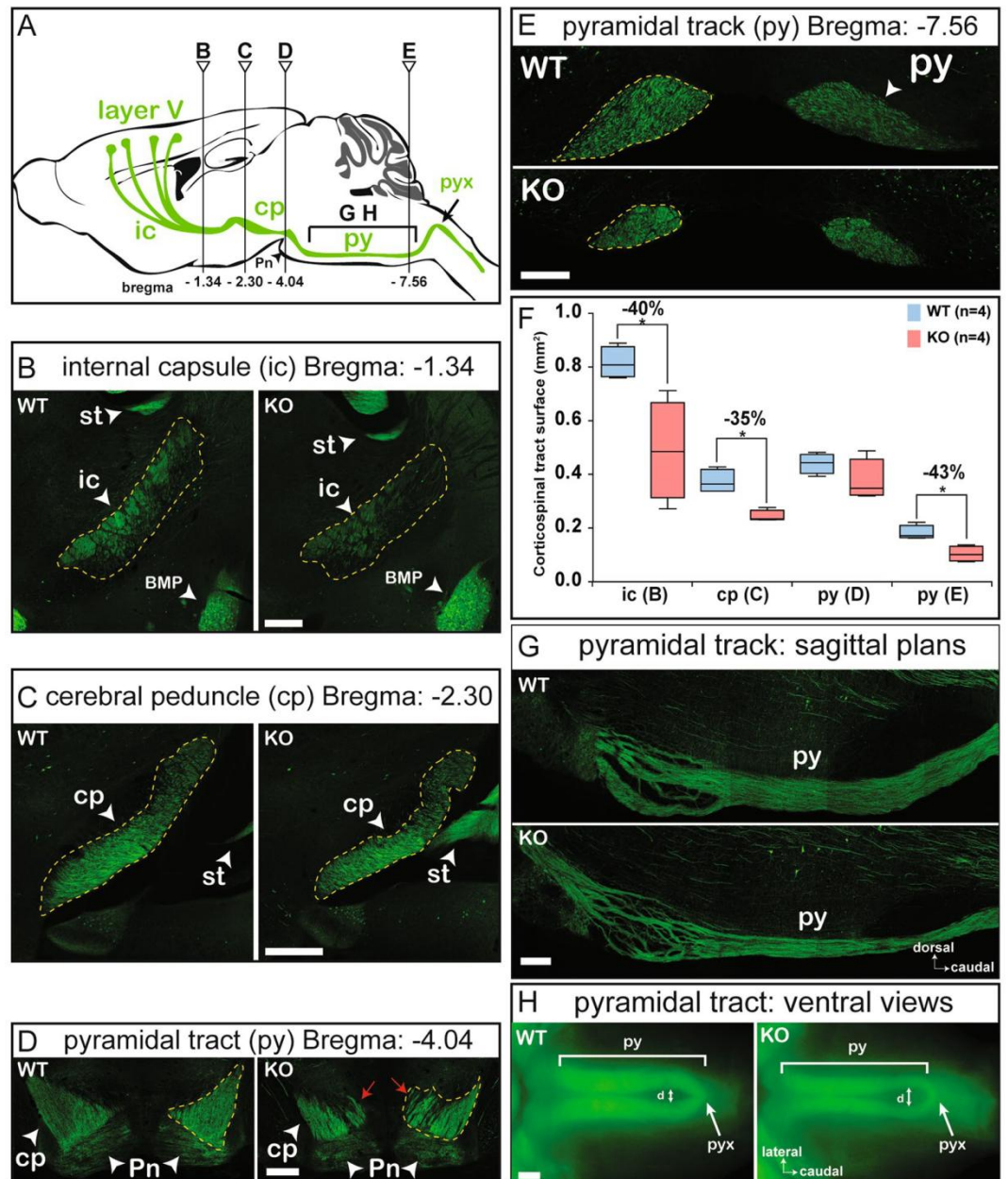
**Figure 5.** 3D DTI tractography reveals disruption of the corticospinal tract. The corticospinal tract is displayed on reference sagittal diffusion images. Corticospinal projections were obtained by applying a restricting ROI within the internal capsule (A, ic) and within the cerebral peduncle (B, cp) or within the pyramidal tract (C, py). In MAP6 KO mice, all reconstructions showed a break-point on the corticospinal tract at level of the pontine nuclei (Pn, yellow arrow).

planning and executing movements; however, our results corroborate some recent studies indicating that the cerebellum is also implicated in many psychiatric disorders such as attention deficit hyperactivity disorder, autism spectrum disorders, schizophrenia, bipolar disorder, major depressive disorder, and anxiety disorders<sup>36, 40, 41</sup>.

For the white matter (WM), an overall reduction in volume of 33% was found, in accordance with our previous findings<sup>21</sup>. However, the loss of white matter was not homogeneously distributed among neuronal tracts, and some tracts were more affected, such as the anterior commissure, the corpus callosum, the mammillary tract and the stria medularis. Regarding the anterior commissure, our results showed that the posterior part is more altered than the anterior part. This result is in agreement with a recent study showing greater defects of the posterior part of the anterior commissure in the Glnm-KO mice, a model of psychiatric disorders<sup>42, 43</sup>. Some tracts (the post-commissural fornix and the corticospinal tract) were severely affected, a result which could explain why the fractional parameter (FA) of white matter was not found to be uniform among all neuronal tracts in MAP6-KO brains<sup>21</sup>. However, the perpendicular ADC ( $ADC_{\perp}$ ) was found to be unchanged (Table 1) suggesting that the myelin fiber sheets are unaffected, a result which is in agreement with those obtained by electron microscopy in our previous work<sup>21</sup>.

DTI tractography further showed that the axonal projections of the pyramidal tract were disrupted at the level of the pontine nuclei. To further investigate this observation, we performed a histological study of the





**Figure 6.** MAP6 deletion affects pyramidal tract integrity. (A) Schematic representation of the corticospinal pathway (green) on a sagittal diagram. The corticospinal tract is mostly formed from axonal projections of cortical layer V. These axons successively pass through the internal capsule (ic), the cerebral peduncle (cp) and the pyramidal tract (py) and decussation (pyx), before terminating in the spinal cord. The Bregma in mm and positions for coronal (B–E) and sagittal planes (G), and ventral view (H) are indicated. (B–E) Coronal images at Bregma  $-1.34$  mm,  $-2.54$  mm,  $-4.04$  mm, and  $-7.56$  mm. In D, red arrows indicate de-fasciculation of the pyramidal tract at the level of the pontine nuclei (Pn). ROIs (dashed yellow lines) delimit the tract area. (F) Corticospinal tract area measured at coronal level (seen in B–E) corresponding to the internal capsule (ic), the cerebral peduncle (cp), the anterior pyramidal tract (py) and the posterior pyramidal tract (py). Black bars represent the median, boxes represent the 25<sup>th</sup> and 75<sup>th</sup> percentiles, and the whiskers represent the 5<sup>th</sup> and 95<sup>th</sup> percentiles (\* $p < 0.05$ ; Mann-Whitney test). Other abbreviations used: st, stria terminalis and BMP, amygdala. (G) Sagittal sections of the pyramidal tract within the brainstem. The pyramidal tract was much thinner in the posterior region of MAP6-KO mice than in WT brains. (H) Ventral views of whole-mount brainstem. Double arrowheads (d) indicate where the interstitial space of the posterior pyramidal tract was measured. Scale bar: 400  $\mu$ m.

pyramidal tract which revealed a severe defasciculation at pontine level (Fig. 6D). The corticospinal tract is the major descending pyramidal tract connecting a subset of layer V cortical neurons to motor neurons and interneurons in the spinal cord. This tract controls voluntary body movement and fine motor functions of the limbs.



MAP6-KO mice have been reported to exhibit motor coordination problems associated with poor performance on the rotarod task<sup>10</sup>. This phenotype could be explained by disruption of corticospinal tract. Interestingly; many MRI studies reported alterations of white matter structures belonging to the corticospinal tract in schizophrenic patients<sup>44–47</sup>. Bilateral decrease of FA in pyramidal and corticopontine tracts was strongly associated with motor performance deficits in adolescent-onset schizophrenia<sup>47</sup> suggesting that functional deficits in schizophrenia are not only confined to social and cognitive domains<sup>48</sup>.

## Conclusion

In this study, 3D DTI tractography was useful to detect major defects in brain connections in MAP6 KO mice. The results highlighted several differences in neuroanatomical volumes and apparent surfaces, as well as abnormalities in tractography present in several key brain regions. The study especially highlights a severe damage of the corticospinal tract with defasciculation at the location of the pontine nuclei. The major neuroanatomical defects obtained here could be considered as psychiatric biomarkers and should help in clinical environment to establish possible correlations between the neuroanatomy changes and specific psychiatric disorders to establish links between brain disconnection and impairments of integrated brain function.

## Materials and Methods

**Ethical approval and mice.** All experiments involving animals were conducted in accordance with the policy of the Institut des Neurosciences of Grenoble (GIN) and the French legislation; experiments were done in compliance with the European Community Council Directive of 24 November 1986 (86/609/EEC). The research involving animals was authorized by the Direction Départementale de la protection des populations—Préfecture de l'Isère-France (Deloulme J. C., PhD, permit number 380822) and by the ethics committee of GIN n° 004 accredited by the French Ministry for of Research. MRI experiments were performed on animals with a 129SvPas/C57BL6-F1 genetic background while fluorescence microscopy on brain slices and on cleared brains were performed on animals with a 129SvPas/C57BL6-Thy1-eYFP-H-F1 genetic background. The homogeneous inbred 129SvPas/C57BL6-F1 WT and MAP6 KO mice were generated by crossing pure 129SvPas MAP6-heterozygous mice with pure C57BL6 MAP6-heterozygous mice. The homogeneous inbred 129SvPas/C57BL6-Thy1-eYFP-H-F1 mice were generated by crossing pure 129SvPas MAP6-heterozygous mice with pure C57BL6-Thy1-eYFP-H-F1 mice. All experiments were conducted on WT or MAP6-KO adult (3–6 months) female or male littermates. To note, although a 2.5% larger whole brain volumes has been reported in C57BL6 males as compared to females<sup>49</sup> in our study with the samples size, no significant difference between sex was found.

For this study, a total of 53 adult mice were used: 31 WT and 30 MAP6-KO. Animals were placed in study groups as follows: 8 WT and 7 MAP6-KO mice for the stereo-macroscopic analysis; 5 WT and 5 MAP6-KO for volumetric MRI; 8 WT and 8 MAP6-KO for DTI tractography; 2 WT and 2 MAP6-KO for fluorescence microscopy on cleared brain; 8 WT (4 sliced in coronal sections and 4 in sagittal sections) and 8 MAP6-KO (4 sliced in coronal sections and 4 in sagittal sections) for corticospinal tract histology.

**Brain preparation for *ex vivo* MRI acquisitions.** Brains were fixed before harvesting from animals by transcardiac perfusion of a paraformaldehyde solution 4% in phosphate buffered saline, to which 6.25 mM of Gd-DOTA was added (Guerbet Laboratories) as contrast agent. The contrast agent was used here to accelerate MRI acquisition time. After removing surrounding skin and muscles, the skulls containing intact brains were immersed in the fixing solution for four days, and then transferred to a Fomblin (FenS chemicals) bath for at least eleven days after brain fixation. This schedule provided homogeneous distribution of the Gd-DOTA throughout the whole brain<sup>51</sup>.

**MRI acquisitions.** *Ex vivo* 3D MRI acquisitions at high spatial resolution were performed at 7 T and 9.4 T (Bruker Biospec Avance III) for DTI and  $T_{1w}$  acquisitions respectively, both using a volume coil for transmission and ahead surface coil for reception.

A 3D  $T_{1w}$  gradient-echo MRI sequence was used for brain segmentation and volumetric analysis with a repetition time of 27.5 ms, an echo time of 5.5 ms, and a flip angle of 20°. The field of view was set to  $10.8 \times 7.44 \times 15.24$  mm<sup>3</sup>, which produced an isotropic spatial resolution of 60  $\mu$ m. The number of signal accumulations was 6, and the total acquisition time was 1 h 40 min for each brain.

3D spin-echo DTI sequence with Cartesian K-space sampling was used for WM imaging and analysis. This sequence was preferred to the rapid echo planar imaging (EPI) sequence as it provided a high isotropic spatial resolution of 80  $\mu$ m while avoiding potential geometric distortions and susceptibility artifacts in a field of view measuring  $20.48 \times 8.5 \times 11.5$  mm<sup>3</sup>. The repetition time, echo time and number of accumulations were set to 90 ms, 16 ms and 22 ms, respectively. Diffusion gradients were applied with duration of  $\delta = 3.5$  ms and a separation duration  $\Delta = 8$  ms, in 6 different spatial orientations [1, 1, 0]; [0, 1, 1]; [1, 0, 1]; [1, -1, 0]; [0, 1, -1]; [-1, 0, 1] with a gradient factor (b-value) of 1500 s/mm<sup>2</sup>. The reference diffusion image was acquired with a low b-value (50 s/mm<sup>2</sup>). The total duration of the microscopic 3D DTI scan was 59 h.

**Analysis of brain volumes.** Brain regions were defined by MRI segmentation on the 3D  $T_{1w}$  MR images. Each cerebral structure was manually delimited using regions of interest (ROI) drawn every five slices on the coronal orientation of the 3D  $T_{1w}$  MRI, using Fiji software<sup>50</sup>. Using the Segmentation editor plug-in ([http://fiji.sc/Segmentation\\_Editor](http://fiji.sc/Segmentation_Editor)) the whole cerebral structure could thus be reconstructed by interpolation between ROIs. Then, all slice were manually corrected based on the mouse brain atlas<sup>51</sup>. Measurements were obtained for the following structures: the caudate putamen (CPU), the cerebellum (CB), the colliculi (CO), the cortex (CX), the globus pallidus (GP), the hippocampal formation (HF), the hypothalamus (HP), the olfactory bulb (OB) and the thalamus (TH). Each structure was color-coded, and its 3D representation and volume were determined using the

3D viewer plug-in in the Fiji software ([https://imagej.net/3D\\_Viewer](https://imagej.net/3D_Viewer)). For each region, the volume was calculated as the number of voxels  $\times$  the voxel volume.

**DTI processing and fiber tracking.** The 3D tractography of WM fibers was computed using the Tensor Toolkit software (<https://gforge.inria.fr/projects/ttk>) after suppressing background noise by applying the following parameters: initial  $FA_1$  value = 0.4, and a cutoff  $FA_2$  value = 0.28. A whole-brain tractogram was then obtained using one seed point per voxel, i.e., 1950 seeds per  $mm^3$ .

3D fiber tractography was performed using the DTI track module provided in MedINRIA software (version 1.9.4; <http://med.inria.fr/>)<sup>52</sup>. Each fiber tract structure was derived from the whole-brain tractogram by restricting streamlines with waypoint ROIs drawn manually on reference diffusion images, as described in Fig. 2B. Two types of ROIs were defined to generate each streamline; one was used to select the fibers (defined here as the restricting ROI), while the other was used to exclude fibers potentially contaminating the selected tract (defined here as the excluding ROI). Fiber statistics such as tract volume, fiber number, mean length and apparent diffusion coefficients ADC were also determined using MedINRIA software. Twelve tracts were mapped (see Supplementary Table 1) using this reconstruction strategy. Reconstructed tracts are represented with a color-coded spatial direction, where blue corresponds to the medial-lateral, red to the dorso-ventral, and green to the caudo-rostral directions. To assess deviation of the mammillary tract (mt) and the fasciculus retroflexus (fr) tract in MAP6 KO mice, we used the angle between the axis of the tract and the vertical axis of the image on sagittal planes. This angle was calculated using ImageJ software.

**Macroscopic analysis of apparent surface.** Fixed brains were photographed using a stereo-microscope (Leica EZ4HD) and the surfaces of cerebral structures, here called apparent surfaces, were manually delineated on photographs using Fiji software<sup>50</sup>.

**Fluorescence microscopy on brain slices and on cleared brains.** All the neuroanatomical abbreviations used in this study were taken from Paxinos's atlas<sup>51</sup>, except for pre-f, pre-commissural fornix; post-f, post-commissural fornix; AH, anterior hypothalamus; SPT, septum; HF, hippocampal formation; CX, cortex; CB, cerebellum; MB, mammillary bodies; OB, olfactory bulb; TH, thalamus, HP, hypothalamus; CO, colliculi.

**Clearing method.** To analyze the fornix system, fixed brains from WT and MAP6-KO C57BL6/129SvPas/Thy1-eYFP mice were bisected at the mid-sagittal plane. Both middle-hemispheres were then cleared using the CUBIC method<sup>53</sup>. Each middle-hemisphere was incubated in Cubic1 reagent (25% urea, 25% N,N,N',N'-tetrakis (2-hydroxypropyl) ethylenediamine and 15% Triton X-100) for 10 days at 37 °C under gentle agitation. The full half-fornix was imaged on a confocal microscope (Zeiss, LSM 710) using a 10x objective with a voxel resolution of  $x = 1.66 \mu m$ ;  $y = 1.66 \mu m$ ; and  $z = 6.5 \mu m$  (Grenoble Photonic Microscopy Facility PIC-GIN). The full half-fornix was then reconstructed using the Fiji 3D stitching plug-in ([http://fiji.sc/Stitching\\_2D/3D](http://fiji.sc/Stitching_2D/3D)).

**Fluorescence microscopy of the corticospinal tract.** Fixed 129SvPas/C57Bl6-Thy1-eYFP brains were cut into 40- $\mu m$  slices using a cryo-microtome (Microm, H560S); slices were mounted on Superfrost plus slides (Menzel-Gläser). Surface quantifications were performed on coronal slices. Epifluorescence of sections was digitized using an Axioscop microscope (Zeiss) equipped with a 5x dry objective and an EMCCD Quantum camera controlled by Metamorph software (Roper Scientific). ROIs were manually drawn and surface areas were calculated using ImageJ software. Since the cerebral volume for WT and KO mice was not the same<sup>21</sup>, the area of the corticospinal tract was quantified on coronal brain sections selected based on morphometric landmarks. Thus, slice B corresponded to the end of the dentate gyrus (Bregma:  $-1.34$  mm); slice C corresponded to the start of the habenular commissure (Bregma:  $-2.30$  mm); Slice D corresponded to the end of cerebral peduncle lateralization and the start of the rubrospinal tract (Bregma:  $-4.04$  mm); and slice E corresponded to the 10<sup>th</sup> slice before the appearance of pyramidal tract decussation (Bregma:  $-7.56$  mm). Epifluorescence for the pyramidal tract was further analyzed on sagittal sections using a confocal microscope (LSM 710, Zeiss), or in whole-mount brainstems using a stereo-microscope (Olympus SZX12).

**Measures and Statistical analyses.** All analyses involving manual processing procedures have been performed by at least two persons who were blinded to genotype information. Statistical analyses were performed using Graphpad Prism (V 5.02). A Mann-Whitney test (Two tailed, CI of 95%) was used to compare data series. Values were considered significant when \* $p < 0.05$ , \*\* $p < 0.01$  and \*\*\* $p < 0.001$ . All results are given as mean  $\pm$  SD (standard deviation). All box-and-whisker plots show 5–95% percentiles.

## References

1. Tischfield, M. A., Cederquist, G. Y., Gupta, M. L. & Engle, E. C. Phenotypic spectrum of the tubulin-related disorders and functional implications of disease-causing mutations. *Curr. Opin. Genet. Dev.* **21**, 286–94 (2011).
2. Bradshaw, N. J. & Hayashi, M. A. F. NDE1 and NDEL1 from genes to (mal)functions: parallel but distinct roles impacting on neurodevelopmental disorders and psychiatric illness. *Cell. Mol. Life Sci.* **74**, 1191–1210 (2017).
3. Marchisella, F., Coffey, E. T. & Hollos, P. Microtubule and microtubule associated protein anomalies in psychiatric disease. *Cytoskeleton* **73**, 596–611 (2016).
4. Bradshaw, N. J. & Porteous, D. J. DISC1-binding proteins in neural development, signalling and schizophrenia. *Neuropharmacology* **62**, 1230–1241 (2012).
5. Friedman, J. R., Webster, B. M., Mastrorade, D. N., Verhey, K. J. & Voeltz, G. K. ER sliding dynamics and ER-mitochondrial contacts occur on acetylated microtubules. *J. Cell Biol.* **190**, 363–75 (2010).
6. Guizetti, J. *et al.* Cortical constriction during abscission involves helices of ESCRT-III-dependent filaments. *Science* **331**, 1616–1620 (2011).
7. Jaglin, X. H. & Chelly, J. Tubulin-related cortical dysgeneses: microtubule dysfunction underlying neuronal migration defects. *Trends Genet.* **25**, 555–66 (2009).



8. Kuijpers, M. & Hoogenraad, C. C. Centrosomes, microtubules and neuronal development. *Mol. Cell. Neurosci.* **48**, 349–358 (2011).
9. Begou, M. *et al.* The stop null mice model for schizophrenia displays [corrected] cognitive and social deficits partly alleviated by neuroleptics. *Neuroscience* **157**, 29–39 (2008).
10. Fradley, R. L. *et al.* STOP knockout and NMDA NR1 hypomorphic mice exhibit deficits in sensorimotor gating. *Behav. Brain Res.* **163**, 257–64 (2005).
11. Fournet, V. *et al.* The deletion of STOP/MAP6 protein in mice triggers highly altered mood and impaired cognitive performances. *J. Neurochem.* **121**, 99–114 (2012).
12. Volle, J. *et al.* Reduced expression of STOP/MAP6 in mice leads to cognitive deficits. *Schizophr. Bull.* **39**, 969–978 (2013).
13. Andrieux, A. *et al.* The suppression of brain cold-stable microtubules in mice induces synaptic defects associated with neuroleptic-sensitive behavioral disorders. *Genes Dev.* **16**, 2350–2364 (2002).
14. Powell, K. J. *et al.* Cognitive impairments in the STOP null mouse model of schizophrenia. *Behav. Neurosci.* **121**, 826–835 (2007).
15. Brun, P. *et al.* Dopaminergic transmission in STOP null mice. *J. Neurochem.* **94**, 63–73 (2005).
16. Bouvrais-Veret, C. *et al.* Sustained increase of alpha7 nicotinic receptors and choline-induced improvement of learning deficit in STOP knock-out mice. *Neuropharmacology* **52**, 1691–700 (2007).
17. Fournet, V. *et al.* The deletion of the microtubule-associated STOP protein affects the serotonergic mouse brain network. *J. Neurochem.* **115**, 1579–1594 (2010).
18. Brenner, E., Sonnenschein, U., Schweitzer, A., Andrieux, A. & Nehlig, A. Hypoglutamatergic activity in the STOP knockout mouse: a potential model for chronic untreated schizophrenia. *J. Neurosci. Res.* **85**, 3487–3493 (2007).
19. Delotterie, D. *et al.* Chronic administration of atypical antipsychotics improves behavioral and synaptic defects of STOP null mice. *Psychopharmacology (Berl.)* **208**, 131–41 (2010).
20. Fournet, V. *et al.* Both chronic treatments by epothilone D and fluoxetine increase the short-term memory and differentially alter the mood status of STOP/MAP6 KO mice. *J. Neurochem.* **123**, 982–996 (2012).
21. Deloulme, J. C. *et al.* Microtubule-associated protein 6 mediates neuronal connectivity through Semaphorin 3E-dependent signalling for axonal growth. *Nat. Commun.* **6**, 7246 (2015).
22. Ishizuka, N. Laminar organization of the pyramidal cell layer of the subiculum in the rat. *J. Comp. Neurol.* **435**, 89–110 (2001).
23. Kishi, T. *et al.* Topographical organization of projections from the subiculum to the hypothalamus in the rat. *J. Comp. Neurol.* **419**, 205–222 (2000).
24. Namura, S., Takada, M., Kikuchi, H. & Mizuno, N. Topographical organization of subicular neurons projecting to subcortical regions. *Brain Res. Bull.* **35**, 221–231 (1993).
25. Swanson, L. W. & Cowan, W. M. An autoradiographic study of the organization of the efferent connections of the hippocampal formation in the rat. *J. Comp. Neurol.* **172**, 49–84 (1977).
26. Wright, N. F., Erichsen, J. T., Vann, S. D., O'Mara, S. M. & Aggleton, J. P. Parallel but separate inputs from limbic cortices to the mammillary bodies and anterior thalamic nuclei in the rat. *J. Comp. Neurol.* **518**, 2334–2354 (2010).
27. Porrero, C., Rubio-Garrido, P., Avendaño, C. & Clascá, F. Mapping of fluorescent protein-expressing neurons and axon pathways in adult and developing Thyl-eYFP-H transgenic mice. *Brain Res.* **1345**, 59–72 (2010).
28. Kerbler, G. M. *et al.* Diffusion-weighted magnetic resonance imaging detection of basal forebrain cholinergic degeneration in a mouse model. *Neuroimage* **66**, 133–141 (2012).
29. Ren, T., Zhang, J., Plachez, C., Mori, S. & Richards, L. J. Diffusion tensor magnetic resonance imaging and tract-tracing analysis of Probst bundle structure in Netrin1- and DCC-deficient mice. *J. Neurosci.* **27**, 10345–9 (2007).
30. Jiang, Y. & Johnson, G. A. Microscopic diffusion tensor imaging of the mouse brain. *Neuroimage* **50**, 465–71 (2010).
31. Gimenez, U. *et al.* Microscopic DTI accurately identifies early glioma cell migration: correlation with multimodal imaging in a new glioma stem cell model. *NMR Biomed.* **29**, 1553–1562 (2016).
32. Henriksen, R., Johnsson, M., Andersson, L., Jensen, P. & Wright, D. *The domesticated brain: genetics of brain mass and brain structure in an avian species.* *bioRxiv*, doi:10.1101/066977 (2016).
33. Barton, R. A. In *Evolution of Nervous Systems* **3**, 97–102 (2010).
34. Couégnas, A., Schweitzer, A., Andrieux, A., Ghandour, M. S. & Boehm, N. Expression pattern of STOP lacZ reporter gene in adult and developing mouse brain. *J. Neurosci. Res.* **85**, 1515–27 (2007).
35. Gory-Faure, S. *et al.* STOP-like Protein 21 Is a Novel Member of the STOP Family, Revealing a Golgi Localization of STOP Proteins. *J. Biol. Chem.* **281**, 28387–28396 (2006).
36. Nenadic, I., Gaser, C. & Sauer, H. Heterogeneity of brain structural variation and the structural imaging endophenotypes in schizophrenia. *Neuropsychobiology* **66**, 44–9 (2012).
37. Pergola, G., Selvaggi, P., Trizio, S., Bertolino, A. & Blasi, G. The Role of the Thalamus in Schizophrenia from a Neuroimaging Perspective. *Neurosci. Biobehav.* **54**, 57–75 (2015).
38. Rasser, P. E. *et al.* Cerebellar grey matter deficits in first-episode schizophrenia mapped using cortical pattern matching. *Neuroimage* **53**, 1175–80 (2010).
39. Walther, S. Psychomotor symptoms of schizophrenia map on the cerebral motor circuit. *Psychiatry Res.* **233**, 293–298 (2015).
40. Phillips, J. R., Hewedi, D. H., Eissa, A. M. & Moustafa, A. A. The cerebellum and psychiatric disorders. *Front. Public Heal.* **3**, 66 (2015).
41. Buckner, R. L. The cerebellum and cognitive function: 25 years of insight from anatomy and neuroimaging. *Neuron* **80**, 807–815 (2013).
42. Corcoba, A. *et al.* Glutathione Deficit Affects the Integrity and Function of the Fimbria/Fornix and Anterior Commissure in Mice: Relevance for Schizophrenia. *Int. J. Neuropsychopharmacol.* **19**, pyv110 (2016).
43. Kulak, A., Cuenod, M. & Do, K. Q. Behavioral phenotyping of glutathione-deficient mice: Relevance to schizophrenia and bipolar disorder. *Behav. Brain Res.* **226**, 563–570 (2012).
44. Bopp, M. H. A. *et al.* White matter integrity and symptom dimensions of schizophrenia: A diffusion tensor imaging study. *Schizophr. Res.* **184**, 59–68 (2017).
45. Asami, T. *et al.* Cerebral white matter abnormalities and their associations with negative but not positive symptoms of schizophrenia. *Psychiatry Res. Neuroimaging* **222**, 52–59 (2014).
46. Čurčić-Blake, B. *et al.* Interaction of language, auditory and memory brain networks in auditory verbal hallucinations. *Prog. Neurobiol.* **148**, 1–20 (2017).
47. Douaud, G. *et al.* Anatomically related grey and white matter abnormalities in adolescent-onset schizophrenia. *Brain* **130**, 2375–2386 (2007).
48. White, T., Ho, B.-C., Ward, J., O'Leary, D. & Andreasen, N. C. Neuropsychological Performance in First-Episode Adolescents with Schizophrenia: A Comparison with First-Episode Adults and Adolescent Control Subjects. *Biol. Psychiatry* **60**, 463–471 (2006).
49. Spring, S., Lerch, J. P. & Henkelman, R. M. Sexual dimorphism revealed in the structure of the mouse brain using three-dimensional magnetic resonance imaging. *Neuroimage* **35**, 1424–33 (2007).
50. Schindelin, J. *et al.* Fiji: an open-source platform for biological-image analysis. *Nat. Methods* **9**, 676–82 (2012).
51. Paxinos, G. & Franklin, K. B. J. Paxinos and Franklin's Mouse Brain in Stereotaxic Coordinates, 3th Edition. *Elsevier* (2008).
52. Fillard, P. & Toussaint, N. Medical Image Navigation and Research Tool by INRIA (MedINRIA). *Enseignement* 1–39 (2006).
53. Susaki, E. A. *et al.* Whole-brain imaging with single-cell resolution using chemical cocktails and computational analysis. *Cell* **157**, 726–39 (2014).

## Acknowledgements

The authors are grateful for technical support from the MRI Facility, Grenoble (IRMaGe) and from the Photonic Microscopy Facility, Grenoble (PIC-GIN). We also thank S. Andrieu, M. Lapierre, F. Mehr, and F. Rimet for animal care, and C. Corrao, and F. Vossier for mouse genotyping. This work was supported in part by an award from the French National Research Agency to A.A. (2010 Blanc, 120201 CBioS) and by a grant from La Ligue contre le cancer to H.L. (comité Isère 2013). PhD stipends for U.G. and B.B. were from the French Ministry for Research and Higher Education.

## Author Contributions

H.L. and J.C.D. conceived and designed the study. U.G. and M.L. performed the M.R.I. experiments, with contributions from F.M., F.T., S.G.F. and J.C.D. B.B. performed fluorescence and optical experiments, with contributions from J.B., S.G.F., E.D. and J.C.D. A.A. provided intellectual input regarding MAP6-KO mice. A.A., H.L. and J.C.D. wrote the manuscript, with contribution from all co-authors.

## Additional Information

**Supplementary information** accompanies this paper at doi:[10.1038/s41598-017-10544-2](https://doi.org/10.1038/s41598-017-10544-2)

**Competing Interests:** The authors declare that they have no competing interest.

**Publisher's note:** Springer Nature remains neutral with regard to jurisdictional claims in published maps and institutional affiliations.



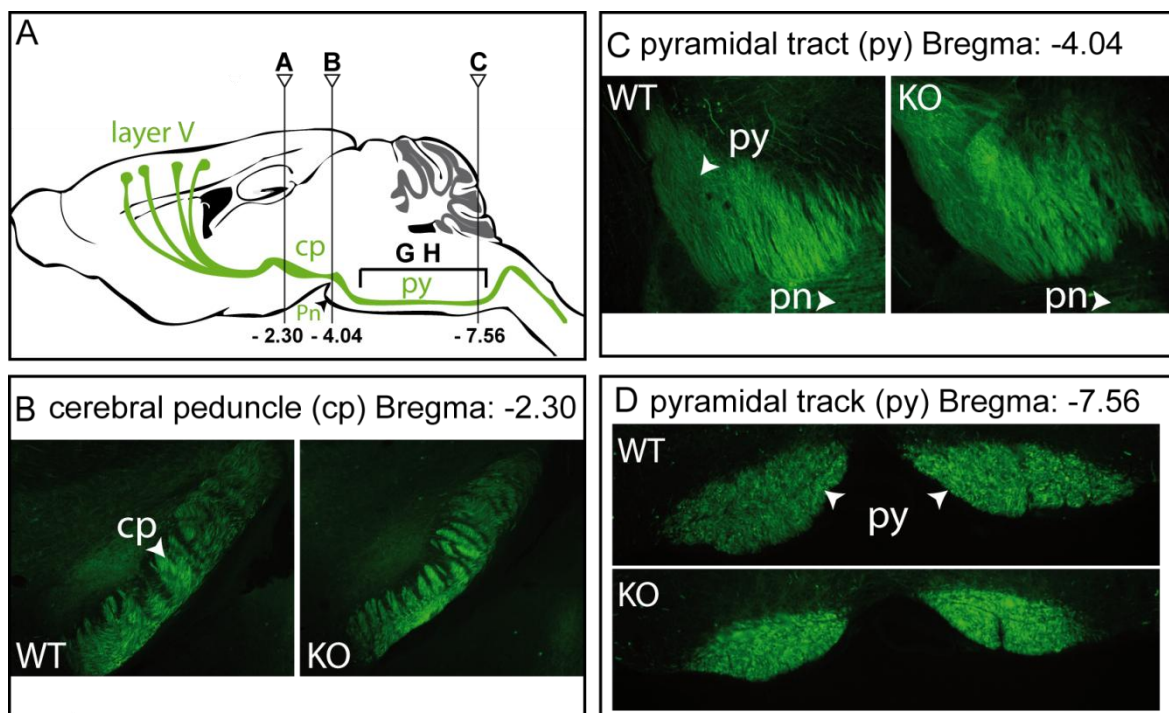
**Open Access** This article is licensed under a Creative Commons Attribution 4.0 International License, which permits use, sharing, adaptation, distribution and reproduction in any medium or format, as long as you give appropriate credit to the original author(s) and the source, provide a link to the Creative Commons license, and indicate if changes were made. The images or other third party material in this article are included in the article's Creative Commons license, unless indicated otherwise in a credit line to the material. If material is not included in the article's Creative Commons license and your intended use is not permitted by statutory regulation or exceeds the permitted use, you will need to obtain permission directly from the copyright holder. To view a copy of this license, visit <http://creativecommons.org/licenses/by/4.0/>.

© The Author(s) 2017

## 10.8 Résultat préliminaire en lien avec l'article de Gimenez et al.

### 10.8.1 Phénocopie du défaut du faisceau pyramidal chez les souris KO CRMP4.

Les souris KO CRMP4, tout comme les souris KO Sema3E, ont un retard de croissance du fornix. Les souris KO MAP6 présentent, elles, un phénotype plus prononcé puisque leur portion post-commissurale du fornix est totalement absente. Nous avons pu mettre en évidence que l'absence de MAP6 conduit à l'altération d'autres connectivités telle que le faisceau pyramidal (Gimenez et al., 2017). Nos résultats préliminaires tendent à montrer que ce phénotype est aussi présent chez les souris KO CRMP4, chez qui le faisceau pyramidal est défasciculé au niveau du noyau pontin et dont la surface semble diminuée en amont dans le pédoncule cérébelleux et en aval dans le bulbe rachidien.



**Figure 21 : Observation du faisceau pyramidal (py) chez les souris KO CRMP4.** Des souris Thy1 de la lignée H dont les neurones pyramidaux de la couche 5 expriment fortement la YFP ont été croisées avec des souris KO CRMP4 comme spécifié dans (Boulan et al. en soumission). Des coupes coronales de l'ensemble de leur cerveau ont été réalisées afin d'observer le faisceau pyramidal à différents niveaux antéro-postérieurs. Sont présentées ici des images de coupes représentatives du faisceau pyramidal observé chez 2 souris KO CRMP4 et 2 souris WT au niveau du pédoncule cérébelleux (cp) (B), du noyau pontin (pn) (C) et plus distalement avec la décussation du faisceau (D).

## 10.9 **Résumé de l'article "Vasohibins/SVBP are tubulin carboxypeptidases (TCP) that regulate neuron differentiation"**

par Chrystelle Aillaud, Christophe Bosc, Leticia Peris, Anouk Bosson, Pierre Heemeryck, Juliette Van Dijk, Julien Le Friec, **Benoit Boulan**, Frédérique Vossier, Laura E. Sanman, Salahuddin Syed, Neri Amara, Yohann Couté, Laurence Lafanechère, Eric Denarier, Christian Delphin, Laurent Pelletier, Sandrine Humbert, Matthew Bogyo, Annie Andrieux, Krzysztof Rogowski, Marie-Jo Moutin.

### **Accepté dans la revue Sciences**

Le cycle de tyrosination/détyrosination de l' $\alpha$ -tubuline, est une modification post-traductionnelle cruciale à la régulation de la dynamique du cytosquelette microtubulaire. Celui-ci est sous le contrôle de deux types d'enzymes. Les enzymes TTL (Tubulin Tyrosin Ligase) sont responsables de la tyrosination de la tubuline et sont relativement bien caractérisées. Les enzymes TCP (Tubulin Carboxy Peptidase) sont elles responsables de la détyrosination et n'ont pas été découvertes jusqu'à présent. Grâce à l'étude des enzymes TTL, il a été montré que l'altération de ce cycle peut causer de nombreuses pathologies, allant de l'invasivité des cellules cancéreuses (Whipple et al., 2010) à des défauts de migrations neuronales (Erck et al., 2005). Cependant sans connaître les enzymes TCP il est difficile de comprendre pleinement ces mécanismes.

Cet article présente l'identification de cette TCP longtemps recherchée. L'utilisation d'un inhibiteur irréversible de l'activité détyrosinase, ainsi qu'une série de purifications couplées à une analyse en spectrométrie de masse des fragments co-purifiés avec l'inhibiteur, a permis d'identifier la protéine VASH1 (vasohibin-1) et son homologue VASH2. Ces deux homologues, lorsqu'ils sont en complexe avec la protéine SVBP (Small Vasohibin Binding Protein), présentent une forte activité détyrosinase *in vitro et in vivo* (Figure 2). L'utilisation de shRNA dirigés contre ce complexe protéique, dans des neurones en culture, induit une diminution de la proportion de microtubules détyrosinés (Figure 3). Ceci conduit à un fort retard de leur différenciation, caractérisé par une diminution du nombre de neurones au stade III de différenciation, une diminution de la longueur axonale moyenne, ainsi qu'une augmentation du nombre de dendrites primaires. De plus, l'ensemble des neurites présentent une augmentation du nombre de leurs branchements (Figure 3).



Enfin l'électroporation *in utero* de ces mêmes shRNA provoque un retard de migration des neurones corticaux chez les embryons de souris (Figure 4) mettant en évidence l'importance de la régulation de cette modification post-traductionnelle dans la différenciation et la migration neuronale.

Ma participation à cette étude a été la création d'une macro, nommée AutoNeuriteJ, codée sous ImageJ, pour permettre la quantification et la classification automatisée de l'ensemble des neurites de neurones en culture (Annexe 1). Cette macro s'utilise à partir de l'acquisition d'une mosaïque d'images d'une culture de neurones sur lamelle de verre après immuno-marquage de l' $\alpha$ -tubuline et des noyaux. Cette culture doit être peu dense afin d'optimiser la probabilité d'observer des neurones isolés les uns des autres. La macro fonctionne en quatre grandes étapes dont seule la première nécessite d'être réalisée manuellement. Ces étapes sont présentées dans la suite de ce chapitre:

Le laboratoire s'est récemment équipé d'un scanner de lame. A l'instar d'un microscope à feuillet de lumière, ce type d'équipement est capable de fournir rapidement une grande quantité de données. En effet, il permet d'obtenir une mosaïque d'images au 10-20X ou 40X de l'ensemble d'une lamelle de culture en quelques minutes, mais aussi de l'ensemble des conditions d'une expérience en quelques heures. Le premier problème que l'on rencontre avec ce type d'acquisition est son analyse, qui nécessite d'être automatisée si l'on veut tirer le meilleur parti de l'acquisition de très nombreux neurones.

1) A partir d'une mosaïque d'images nous pouvons extraire une image binaire de ces neurones ainsi que de leurs noyaux pour obtenir les trois types d'images suivantes dont la macro pourra mesurer les paramètres.

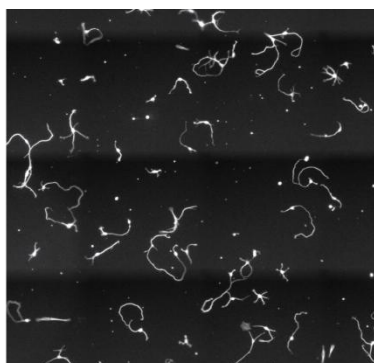
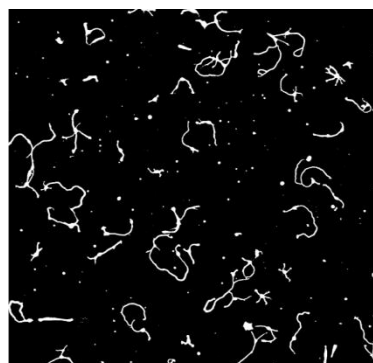


Image originale



Neurones binarisés



Noyaux

Figure 22 : Exemple d'un fragment de mosaïque d'une culture de neurones et des images complémentaires à créer pour le fonctionnement d'AutoNeuriteJ.

2) A partir de ces 3 images, les débris sont automatiquement éliminés (sur le critère de leur petite surface et d'absence de noyaux associés), ainsi que les noyaux non associés à un marquage tubuline (correspondant en général à des cellules mortes). Un squelette de chacun des neurones isolés est généré par la fonction "Skeletonize (2D/3D)" d'ImageJ (Arganda-Carreras et al., 2010). Enfin, en utilisant la fonction "BinaryConditionalDilate" d'ImageJ (Landini, 2008), qui par remplissage partiel de l'image binaire du neurone à partir de la position du noyau, la macro va créer le corps cellulaire à superposer au squelette.

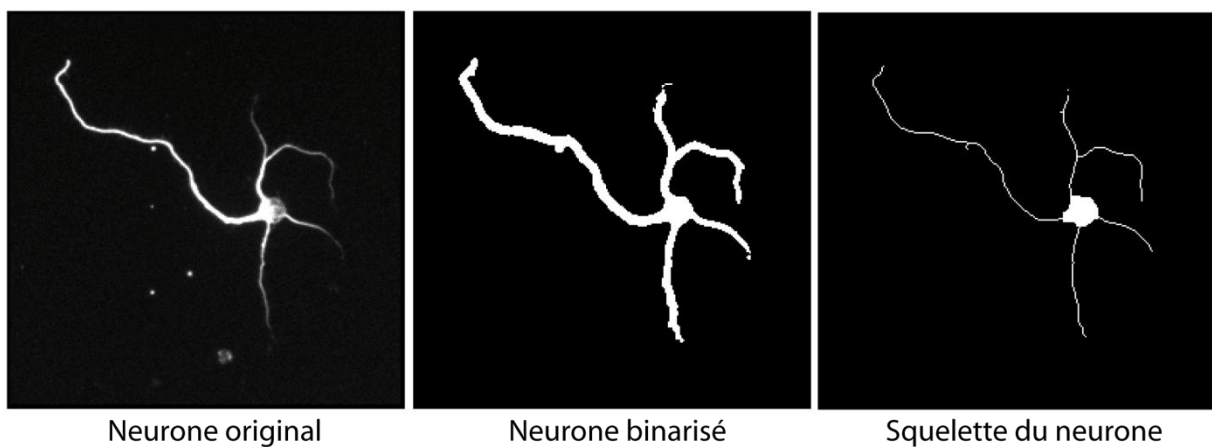


Figure 23 : Exemple d'un neurone quantifié dont la macro utilise l'image binaire pour en générer un squelette partant du soma.

3) Chacune des branches du squelette est mesurée, comparée avec les autres pour déterminer le prolongement majeur et superposée avec les autres pour déterminer, en cas de contact, leur hiérarchie par rapport au corps cellulaire (primaire, secondaire, tertiaire etc...). L'encodage en couleur de cette hiérarchie permet ainsi la représentation des neurones tel que présenté dans la Figure 3 afin de faciliter le contrôle visuel de l'analyse.

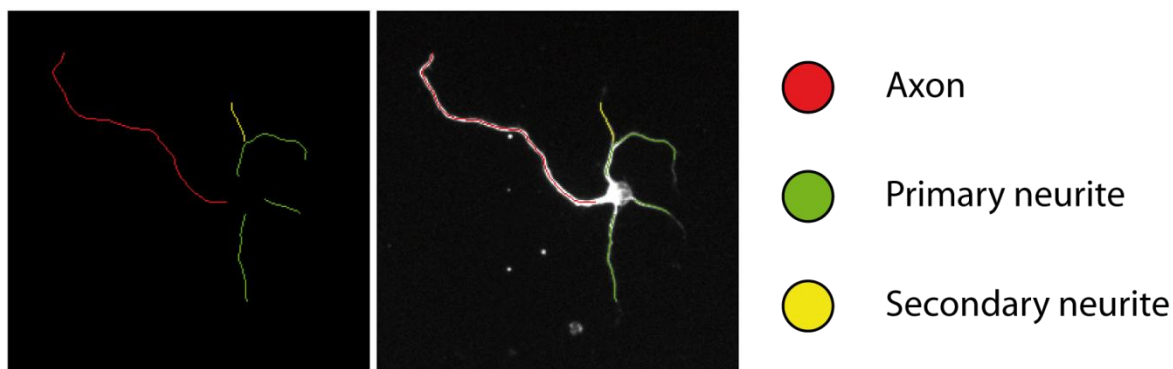


Figure 24 : Exemple de résultat obtenu après comparaison des neurites d'un neurone.

4) Enfin, un fichier compatible avec Excel est créé, dans lequel les paramètres suivants sont stockés pour chacun des neurones :

Numéro du neurone (dans l'ordre croissant de détection)

Nombre de primaires

Ordre pour chacun des neurites (primaire, secondaire etc...)

Taille moyenne des primaires

Longueur de chacun des neurites

Longueur du neurite primaire majeur

Longueur de l'axone s'il existe (\*)

Longueur de l'arbre axonal (taille de l'axone et de ses branchements)

Nombre de branchements sur l'axone.

(\*) : L'axone est déterminé sur la base de paramètres modulables prenant en compte une taille minimum ainsi qu'une taille supérieure à l'ensemble des autres neurites. Par exemple, dans cet article la taille minimale a été fixée à  $48\mu\text{m}$ , avec une longueur d'axone devant être 1,3 fois supérieure à n'importe quel autre neurite.

Une sauvegarde automatique de chacune de ces étapes est réalisée par la macro afin de pouvoir contrôler leur bon déroulement. Pour finir une gestion de plusieurs répertoires a été implémentée de façon à permettre le lancement successif de l'analyse de plusieurs conditions de cultures.

#### 10.10 **Article 4 : "Vasohibins/SVBP are tubulin carboxypeptidases (TCP) that regulate neuron differentiation"**

**Title:****Vasohibins/SVBP are tubulin carboxypeptidases (TCP)  
that regulate neuron differentiation****Authors:**

Chrystelle Aillaud<sup>1,2</sup>, Christophe Bosc<sup>1,2</sup>, Leticia Peris<sup>1,2</sup>, Anouk Bosson<sup>1,2</sup>, Pierre Heemeryck<sup>1,2</sup>, Juliette Van Dijk<sup>3,4</sup>, Julien Le Fric<sup>1,2</sup>, Benoit Boulan<sup>1,2</sup>, Frédérique Vossier<sup>1,2</sup>, Laura E. Sanman<sup>5</sup>, Salahuddin Syed<sup>5</sup>, Neri Amara<sup>5</sup>, Yohann Couté<sup>6</sup>, Laurence Lafanechère<sup>7</sup>, Eric Denarier<sup>1,2,8</sup>, Christian Delphin<sup>1,2</sup>, Laurent Pelletier<sup>1,2</sup>, Sandrine Humbert<sup>1,2</sup>, Matthew Bogyo<sup>5</sup>, Annie Andrieux\*<sup>1,2,8†</sup>, Krzysztof Rogowski\*<sup>3†</sup>, and Marie-Jo Moutin\*<sup>1,2</sup>.

**Affiliations :**

<sup>1</sup>Univ. Grenoble Alpes, Grenoble Institut des Neurosciences, GIN, F-38000 Grenoble, France

<sup>2</sup>Inserm, U1216, F-38000 Grenoble, France.

<sup>3</sup>CNRS UMR9002, Institut de Génétique Humaine, IGH, Univ. Montpellier, 34000 Montpellier, France.

<sup>4</sup>CNRS UMR5237, Centre de Recherche en Biochimie Macromoléculaire, CRBM, Univ. Montpellier, 34000 Montpellier, France.

<sup>5</sup>Department of Pathology, Stanford University School of Medicine, Stanford, California 94305, USA.

<sup>6</sup>Univ. Grenoble Alpes, CEA, INSERM, BIG-BGE, F-38000 Grenoble, France.

<sup>7</sup>Team Regulation & Pharmacology of the Cytoskeleton, Institute for Advanced Biosciences, INSERM U 1209, CNRS UMR 5309, Univ. Grenoble Alpes, 38000 Grenoble, France.

<sup>8</sup>CEA, BIG-GPC, F-38000 Grenoble, France.

\*Correspondence to: moutinm@univ-grenoble-alpes.fr, annie.andrieux@univ-grenoble-alpes.fr, or krzysztof.rogowski@igh.cnrs.fr.

†These authors contributed equally to this work

**Abstract:**

Reversible detyrosination of  $\alpha$ -tubulin is crucial to microtubule dynamics and functions and defects have been implicated in cancer, brain disorganization and cardiomyopathies. The identity of the tubulin tyrosine carboxypeptidase (TCP) responsible for detyrosination has remained unclear. We used chemical proteomics with a potent unique irreversible inhibitor to show that the major brain TCP is a complex of vasohibin-1 (VASH1) with the Small Vasohibin Binding Protein (SVBP). VASH1 and its homologue VASH2, when complexed with SVBP, exhibited robust and specific Tyr/Phe carboxypeptidase activity on microtubules. Knock down of vasohibins or SVBP and/or inhibitor addition in cultured neurons reduced detyrosinated  $\alpha$ -tubulin levels and caused severe differentiation defects. Furthermore, knock down of vasohibins disrupted neuronal migration in developing mouse neocortex. Thus vasohibin/SVBP complexes represent long sought TCP enzymes.

**One sentence summary:**

Vasohibins complexed to SVBP detyrosinate  $\alpha$ -tubulin and play a role in neuron polarization and brain cortex development.

**Main text:**

1 Microtubules are cytoskeletal polymers of  $\alpha/\beta$  tubulin dimers centrally involved in cell division,  
 2 motility and morphogenesis. In the detyrosination/tyrosination cycle of tubulin, the C-terminal  
 3 tyrosine of  $\alpha$ -tubulin is removed by an elusive peptidase (TCP) and re-added by the tubulin tyrosine  
 4 ligase (TTL, for review see (1)). This cycle, which is unique to tubulin and mostly conserved from  
 5 chordates to mammals, has a vital role in vivo (2). Tubulin de/tyrosination of  $\alpha$ -tubulin is an  
 6 important regulatory signal for mitosis (3-5), for neuronal physiology (6-8), and for muscle  
 7 mechanotransduction (9, 10). Consequently, abnormal tyrosination levels are associated with cell  
 8 transformation and tumor aggressiveness (11, 12), neuronal disorganization (2), and heart failure  
 9 and cardiomyopathies (10, 13). Although the detyrosination reaction was first described 40 years  
 10 ago (14), the identity of TCP has remained unknown.

11 To enrich for TCP, we designed a three step purification procedure using taxol-stabilized  
 12 radiolabelled tyrosinated microtubules as a substrate to follow activity. A typical procedure gave a  
 13 final purification factor of nearly 400-fold (Figs. 1A and S1A). The last fraction (IV) was able to  
 14 cleave the C-terminal tyrosine from tubulin incorporated in microtubules but not from EB1 (Fig.  
 15 S1B). EB1 is a protein that shares a similar C-terminal sequence with  $\alpha$ -tubulin (-QEEY instead of -  
 16 GEEY) and is generally not a substrate for TCP in physiological contexts (15).

17 To isolate the protein(s) responsible for TCP activity from fraction IV, we reasoned that an  
 18 irreversible inhibitor could be used as in other chemical proteomic studies (16). We tested the  
 19 sensitivity of brain TCP to various commercial protease inhibitors. The activity was inhibited by  
 20 several serine/cysteine protease inhibitors (AEBSF, TLCK, TPCK, E-64, parthenolide) and by the  
 21 thiol-reactive compound N-Ethylmaleimide (Figs. S2A and 1B). These results, in agreement with  
 22 prior studies (17), strongly suggested that the catalytic activity of the putative TCP depends on a  
 23 catalytic cysteine.



24 Although E-64 only showed modest inhibitory activity ( $IC_{50}$  around 300  $\mu$ M, Fig. 1B), it is an  
25 ideal starting point for inhibitor design because its reactive epoxide electrophile can display a  
26 peptide or amino acid mimicking native protein C-terminus. Furthermore, parthenolide, which is  
27 widely used to down-regulate detyrosination levels in cells (4, 6, 9, 10), contains an epoxide  
28 function which is essential to its cellular effect (17). We thus synthesized three inhibitors, epoY,  
29 epoEY and epoEEY, which contain the epoxide coupled to one, two or three amino-acids from the  
30  $\alpha$ -tubulin C-terminus (Fig. S2B). EpoY was the most potent inhibitor of the TCP activity ( $IC_{50}$   
31 around 500 nM, Fig. 1B). Alkyne-epoY, which retained a strong inhibitory potency (Fig. 1B, C)  
32 and irreversibly inhibited the activity (Fig. S2C, D), was used to perform TAMRA labeling of  
33 fraction IV by click chemistry (Fig. 1D). This labeling showed specific modification of a small  
34 number of proteins (Fig. 1E). We then purified the inhibitor targets using agarose beads and, after  
35 on-beads trypsin digestion and quantitative mass spectrometry analyses of the resulting peptides  
36 from three independent experiments, we identified the protein vasohibin-1 (VASH1) as the most  
37 likely TCP candidate (Fig 1D, Tables S1-S2). Peptides covering the almost full VASH1 sequence  
38 were detected (Fig. S2E). Furthermore, recent bioinformatics data show that Vasohibin-1 and its  
39 homologue vasohibin-2 (VASH2) possess a non-canonical Cys-His-Ser catalytic triad and are  
40 members of the transglutaminase-like cysteine proteases family (18) (Fig. 1F).

41 Vasohibin proteins (41-42 kDa) have been extensively characterized as angiogenesis regulators  
42 but are poorly understood on a molecular level (19). SVBP (Ccdc23) is a high affinity binding  
43 partner of vasohibins that has a chaperone-like function (20). We examined the ability of VASH  
44 proteins to detyrosinate  $\alpha$ -tubulin in cells in the absence or presence of SVBP. Expression of  
45 vasohibins alone in HEK293T cells resulted in a slight increase of detyrosinated tubulin, whereas  
46 expression of either protein with SVBP resulted in a substantial increase in detyrosinated tubulin  
47 corresponding to a nearly complete loss of endogenous tyrosinated tubulin (Fig. 2A). Mutation of  
48 the putative catalytic cysteine on vasohibins (C179A for VASH1, and C158A for VASH2 (18))

49 abolished their capacity to produce detyrosinated tubulin. Similarly, in murine embryonic  
50 fibroblasts (MEF), expression of the vasohibins with SVBP resulted in complete detyrosination of  
51 endogenous  $\alpha$ -tubulin (Figs. 2B and S3A).

52 Alpha-tubulins are generally encoded with a C-terminal tyrosine preceded by two glutamates.  
53 Alpha4-tubulin lacks the C-terminal tyrosine and  $\alpha$ 8-tubulin contains a C-terminal phenylalanine  
54 residue. Phenylalanine can be incorporated in place of tyrosine in tubulin and be a possible cause of  
55 neuronal dysfunction (21). We tested the substrate specificity of the vasohibins by overexpressing  
56  $\alpha$ 1B- and  $\alpha$ 8-tubulin together with VASH1 or VASH2 and SVBP in HEK293T cells. Both tubulin  
57 isoforms were cleaved by active vasohibins when expressed with SVBP (Figs. 2C and S3B).  
58 Vasohibins were unable to cleave the C-terminal residue when tyrosine was mutated to alanine  
59 (Figs. 2C and S3B), confirming the specificity of VASH proteins for C-terminal tyrosine and  
60 phenylalanine residues.

61 We overexpressed vasohibins in HEK293T cells in the absence or presence of SVBP and  
62 purified the resulting complexes using a cobalt resin. SVBP co-purified with both vasohibins as  
63 expected from previous affinity measurements, ( $K_D$  30-90 nM (20)), and complex formation was  
64 not dependent on catalytic activity (Fig. S4A). The two protein complexes efficiently catalyzed  
65 tubulin detyrosination while complexes containing the catalytic dead versions of the vasohibins  
66 were unable to detyrosinate tubulin (Fig. 2D). Both complexes cleaved microtubules more rapidly  
67 compared to tubulin dimers (Fig. 2E, S4B), consistent with the reported preference of brain TCP in  
68 in vitro experiments (1, 22, 23). Purified VASH1/SVBP complex was not able to cleave the  
69 C-terminal tyrosine from EB1 indicating its clear tubulin preference. Intriguingly VASH2/SVBP  
70 complex was able to partially detyrosinate EB1 in the same conditions (Fig. 2F). In most cell types,  
71 including neuronal-derived, C-terminal tyrosine cleavage is restricted to tubulin (1, 15). EB1 can  
72 however be detyrosinated in specific endothelial and tumor cells (24) and this may be related to  
73 their VASH2 contents or defect in a regulatory mechanism.

74 To confirm the functional significance of vasohibins and their role in  $\alpha$ -tubulin detyrosination,  
75 we assessed the phenotypic effects of knocking down expression of these proteins in differentiating  
76 neurons where the de/tyrosination cycle is highly important for growth cone pathfinding and axon  
77 differentiation, i. e. for neuron polarization (2, 7, 8). Although we were unable to detect vasohibins  
78 and SVBP by immuno-blot in mouse neurons using commercial antibodies, we amplified their  
79 transcripts from RNA preparations of cultured hippocampal neurons as well as of adult and  
80 embryonic mouse brain tissues (Fig. 3A, S5A, S6A). We transfected hippocampal neurons with  
81 plasmids expressing short hairpin RNAs (shRNAs) targeting either the vasohibins or SVBP  
82 (validated in Fig. S5B and S6B) as well as control shRNAs. The levels of detyrosinated  $\alpha$ -tubulin  
83 were decreased by almost 50 % when the two vasohibins, or the SVPB, were down-regulated.  
84 Addition of inhibitor (alkyne-epoY) also largely reduced detyrosinated  $\alpha$ -tubulin (Fig. 3B, C, S5C).  
85 When added together with the shRNAs, levels of detyrosinated tubulin were decreased up to 75 %  
86 (Fig. 3B, C). The remaining pool of detyrosinated  $\alpha$ -tubulin could be due to uncomplete depletion  
87 of vasohibins activities or to the presence of  $\alpha$ 4-tubulin which genetically lacks the C-terminal  
88 tyrosine and remains in detyrosinated form in the brain (25). The occurrence of other detyrosinases  
89 can however not be excluded. Confocal images of neurons cultured 2 days in vitro (2DIV)  
90 confirmed a decrease in the levels of the native detyrosinated  $\alpha$ -tubulin upon reduction or inhibition  
91 of vasohibins expression (Fig. 3D). The remaining detyrosinated pools were specifically  
92 concentrated in the axon, while  $\alpha$ -tubulin in the other neurites appeared highly tyrosinated.  
93 Vasohibins down-regulation led to a clear delay in axonal differentiation (Fig. 3E). Tau and ankyrin  
94 G staining of neurons bearing an axon confirmed normal distribution, with Tau highly expressed in  
95 axon shaft at 3DIV and ankyrin G in the axon initial segment at 10DIV (Fig. S7). 2DIV neurons  
96 knocked down for vasohibins developed an increased number of neurites and branches with overall  
97 reduced axon length (Fig. 3F). A delay of axon differentiation and similar morphological anomalies  
98 were observed when down-regulating SVBP (Fig. S6D-F). Transfection of a plasmid allowing

99 coexpression of shRNAs targeting SVBP and a shRNA-resistant form of SVBP rescued  $\alpha$ -tubulin  
 100 de/tyrosination levels (Fig. S6A, C). Thus, contrary to the premature axonal differentiation observed  
 101 in the absence of the reverse enzyme TTL (2), here we observe a clear delay of axon differentiation  
 102 when down-regulating vasohibins or SVBP.

103 We next tested the functional significance of vasohibins in vivo in mouse brain and focused on  
 104 the cerebral cortex where the de/tyrosination cycle is critical for the neocortex layer organization  
 105 (2). During corticogenesis neuronal migration relies in part on neuron polarization which was  
 106 highly dependent on vasohibins (Fig. 3D, E) and SVBP (Fig. S6D, E). We electroporated E14.5  
 107 embryos with the plasmids expressing shRNAs targeting the vasohibins as well as control shRNA,  
 108 and analyzed radial neuronal migration four days later. At E18.5, most neurons from control brains  
 109 had reached the upper layer (bin 1), whereas when vasohibins were downregulated a significant  
 110 fraction of neurons failed to do so (Fig 4A, B). Thus, these enzymes have a crucial role in neuronal  
 111 migration during brain cortex development.

112 TCP remained the crucial missing element of the  $\alpha$ -tubulin de/tyrosination cycle for 40 years.  
 113 Here, we identify vasohibins as enzymatic proteins that perform the TCP function (Fig. S8). The  
 114 failure of prior attempts to identify TCPs most probably resulted from their association with SVBP  
 115 for stability and activity which could likely be lost during standard purification assays. In agreement  
 116 with TCP functions, vasohibins are widely distributed in eucaryotes, have broad tissue expression,  
 117 and vasohibin-1 (which is generally more expressed than vasohibin-2) is abundant in brain, heart  
 118 and kidney (18, 26, 27) (see also GTEx Portal on <https://www.gtexportal.org/home/>). Additionally,  
 119 we demonstrated their critical role in neuron and brain physiology.

## References and notes:

1. H. S. Barra, C. A. Arce, C. E. Argarana, Posttranslational tyrosination/detyrosination of tubulin. *Molecular neurobiology* **2**, 133-153 (1988).



2. C. Erck, L. Peris, A. Andrieux, C. Meissirel, A. D. Gruber, M. Vernet, A. Schweitzer, Y. Saoudi, H. Pointu, C. Bosc, P. A. Salin, D. Job, J. Wehland, 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 (2005).
3. A. C. Badin-Larcon, C. Boscheron, J. M. Soleilhac, M. Piel, C. Mann, E. Denarier, A. Fourest-Lieuvin, L. Lafanechere, M. Bornens, D. Job, Suppression of nuclear oscillations in *Saccharomyces cerevisiae* expressing Glu tubulin. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* **101**, 5577-5582 (2004).
4. M. Barisic, R. Silva e Sousa, S. K. Tripathy, M. M. Magiera, A. V. Zaytsev, A. L. Pereira, C. Janke, E. L. Grishchuk, H. Maiato, Mitosis. Microtubule detyrosination guides chromosomes during mitosis. *Science (New York, N.Y)* **348**, 799-803 (2015).
5. L. Peris, M. Thery, J. Faure, Y. Saoudi, L. Lafanechere, J. K. Chilton, P. Gordon-Weeks, N. Galjart, M. Bornens, L. Wordeman, J. Wehland, A. Andrieux, D. Job, Tubulin tyrosination is a major factor affecting the recruitment of CAP-Gly proteins at microtubule plus ends. *The Journal of cell biology* **174**, 839-849 (2006).
6. P. Gobrecht, A. Andreadaki, H. Diekmann, A. Heskamp, M. Leibinger, D. Fischer, Promotion of Functional Nerve Regeneration by Inhibition of Microtubule Detyrosination. *J Neurosci* **36**, 3890-3902 (2016).
7. Y. Konishi, M. Setou, Tubulin tyrosination navigates the kinesin-1 motor domain to axons. *Nat Neurosci* **12**, 559-567 (2009).
8. S. Marcos, J. Moreau, S. Backer, D. Job, A. Andrieux, E. Bloch-Gallego, Tubulin tyrosination is required for the proper organization and pathfinding of the growth cone. *PloS one* **4**, e5405 (2009).
9. J. P. Kerr, P. Robison, G. Shi, A. I. Bogush, A. M. Kempema, J. K. Hexum, N. Becerra, D. A. Harki, S. S. Martin, R. Raiteri, B. L. Prosser, C. W. Ward, Detyrosinated

- microtubules modulate mechanotransduction in heart and skeletal muscle. *Nature communications* **6**, 8526 (2015).
10. P. Robison, M. A. Caporizzo, H. Ahmadzadeh, A. I. Bogush, C. Y. Chen, K. B. Margulies, V. B. Shenoy, B. L. Prosser, Detyrosinated microtubules buckle and bear load in contracting cardiomyocytes. *Science (New York, N.Y)* **352**, aaf0659 (2016).
  11. L. Lafanechere, C. Courtay-Cahen, T. Kawakami, M. Jacrot, M. Rudiger, J. Wehland, D. Job, R. L. Margolis, Suppression of tubulin tyrosine ligase during tumor growth. *Journal of cell science* **111 ( Pt 2)**, 171-181 (1998).
  12. R. A. Whipple, M. A. Matrone, E. H. Cho, E. M. Balzer, M. I. Vitolo, J. R. Yoon, O. B. Ioffe, K. C. Tuttle, J. Yang, S. S. Martin, Epithelial-to-mesenchymal transition promotes tubulin detyrosination and microtentacles that enhance endothelial engagement. *Cancer Res* **70**, 8127-8137 (2010).
  13. S. Belmadani, C. Pous, R. Ventura-Clapier, R. Fischmeister, P. F. Mery, Post-translational modifications of cardiac tubulin during chronic heart failure in the rat. *Molecular and cellular biochemistry* **237**, 39-46 (2002).
  14. M. E. Hallak, J. A. Rodriguez, H. S. Barra, R. Caputto, Release of tyrosine from tyrosinated tubulin. Some common factors that affect this process and the assembly of tubulin. *FEBS Lett* **73**, 147-150 (1977).
  15. A. Bosson, J. M. Soleilhac, O. Valiron, D. Job, A. Andrieux, M. J. Moutin, Cap-Gly proteins at microtubule plus ends: is EB1 detyrosination involved? *PloS one* **7**, e33490 (2012).
  16. M. A. Child, C. I. Hall, J. R. Beck, L. O. Ofori, V. E. Albrow, M. Garland, P. W. Bowyer, P. J. Bradley, J. C. Powers, J. C. Boothroyd, E. Weerapana, M. Bogoyo, Small-molecule inhibition of a depalmitoylase enhances *Toxoplasma* host-cell invasion. *Nat Chem Biol* **9**, 651-656 (2013).



17. X. Fonrose, F. Ausseil, E. Soleilhac, V. Masson, B. David, I. Pouny, J. C. Cintrat, B. Rousseau, C. Barette, G. Massiot, L. Lafanechere, Parthenolide inhibits tubulin carboxypeptidase activity. *Cancer Res* **67**, 3371-3378 (2007).
18. L. Sanchez-Pulido, C. P. Ponting, Vasohibins: new transglutaminase-like cysteine proteases possessing a non-canonical Cys-His-Ser catalytic triad. *Bioinformatics* **32**, 1441-1445 (2016).
19. Y. Sato, The vasohibin family: a novel family for angiogenesis regulation. *Journal of biochemistry* **153**, 5-11 (2013).
20. Y. Suzuki, M. Kobayashi, H. Miyashita, H. Ohta, H. Sonoda, Y. Sato, Isolation of a small vasohibin-binding protein (SVBP) and its role in vasohibin secretion. *Journal of cell science* **123**, 3094-3101 (2010).
21. Y. Ditamo, Y. M. Dentesano, S. A. Purro, C. A. Arce, C. G. Bisig, Post-Translational Incorporation of L-Phenylalanine into the C-Terminus of alpha-Tubulin as a Possible Cause of Neuronal Dysfunction. *Scientific reports* **6**, 38140 (2016).
22. G. G. Deanin, S. F. Preston, R. K. Hanson, M. W. Gordon, On the mechanism of turnover of the carboxy-terminal tyrosine of the alpha chain of tubulin. *Eur J Biochem* **109**, 207-216 (1980).
23. N. Kumar, M. Flavin, Preferential action of a brain detyrosinating carboxypeptidase on polymerized tubulin. *The Journal of biological chemistry* **256**, 7678-7686 (1981).
24. A. Rovini, G. Gauthier, R. Berges, A. Kruczynski, D. Braguer, S. Honore, Anti-migratory effect of vinflunine in endothelial and glioblastoma cells is associated with changes in EB1 C-terminal detyrosinated/tyrosinated status. *PloS one* **8**, e65694 (2013).
25. V. Redeker, Mass spectrometry analysis of C-terminal posttranslational modifications of tubulins. *Methods Cell Biol* **95**, 77-103 (2010).

26. S. Nimmagadda, P. Geetha-Loganathan, F. Prols, M. Scaal, B. Christ, R. Huang, Expression pattern of Vasohibin during chick development. *Dev Dyn* **236**, 1358-1362 (2007).
27. T. Shibuya, K. Watanabe, H. Yamashita, K. Shimizu, H. Miyashita, M. Abe, T. Moriya, H. Ohta, H. Sonoda, T. Shimosegawa, K. Tabayashi, Y. Sato, Isolation and characterization of vasohibin-2 as a homologue of VEGF-inducible endothelium-derived angiogenesis inhibitor vasohibin. *Arteriosclerosis, thrombosis, and vascular biology* **26**, 1051-1057 (2006).
28. S. Ramirez-Rios, E. Denarier, E. Prezel, A. Vinit, V. Stoppin-Mellet, F. Devred, P. Barbier, V. Peyrot, C. L. Sayas, J. Avila, L. Peris, A. Andrieux, L. Serre, A. Fourest-Lieuvin, I. Arnal, Tau antagonizes end-binding protein tracking at microtubule ends through a phosphorylation-dependent mechanism. *Molecular biology of the cell* **27**, 2924-2934 (2016).
29. C. E. Argarana, H. S. Barra, R. Caputto, Tubuliny-tyrosine carboxypeptidase from chicken brain: properties and partial purification. *Journal of neurochemistry* **34**, 114-118 (1980).
30. J. Milbradt, A. Kraut, C. Hutterer, E. Sonntag, C. Schmeiser, M. Ferro, S. Wagner, T. Lenac, C. Claus, S. Pinkert, S. T. Hamilton, W. D. Rawlinson, H. Sticht, Y. Coute, M. Marschall, Proteomic analysis of the multimeric nuclear egress complex of human cytomegalovirus. *Mol Cell Proteomics* **13**, 2132-2146 (2014).
31. J. D. Pedelacq, S. Cabantous, T. Tran, T. C. Terwilliger, G. S. Waldo, Engineering and characterization of a superfolder green fluorescent protein. *Nat Biotechnol* **24**, 79-88 (2006).

32. I. Arganda-Carreras, R. Fernandez-Gonzalez, A. Munoz-Barrutia, C. Ortiz-De-Solorzano, 3D reconstruction of histological sections: Application to mammary gland tissue. *Microsc Res Tech* **73**, 1019-1029 (2010).
33. M. Barnat, J. Le Fricc, C. Benstaali, S. Humbert, Huntingtin-Mediated Multipolar-Bipolar Transition of Newborn Cortical Neurons Is Critical for Their Postnatal Neuronal Morphology. *Neuron* **93**, 99-114 (2017).
34. V. K. Khodiyar, L. J. Maltais, B. J. Ruef, K. M. Sneddon, J. R. Smith, M. Shimoyama, F. Cabral, C. Dumontet, S. K. Dutcher, R. J. Harvey, L. Lafanechere, J. M. Murray, E. Nogales, D. Piquemal, F. Stanchi, S. Povey, R. C. Lovering, A revised nomenclature for the human and rodent alpha-tubulin gene family. *Genomics* **90**, 285-289 (2007).
35. C. Aillaud, C. Bosc, Y. Saoudi, E. Denarier, L. Peris, L. Sago, N. Taulet, A. Cieren, O. Tort, M. M. Magiera, C. Janke, V. Redeker, A. Andrieux, M. J. Moutin, Evidence for new C-terminally truncated variants of alpha- and beta-tubulins. *Molecular biology of the cell* **27**, 640-653 (2016).
36. L. Paturle-Lafanechere, M. Manier, N. Trigault, F. Pirollet, H. Mazarguil, D. Job, Accumulation of delta 2-tubulin, a major tubulin variant that cannot be tyrosinated, in neuronal tissues and in stable microtubule assemblies. *Journal of cell science* **107 ( Pt 6)**, 1529-1543 (1994).
37. K. Rogowski, 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, C. Janke, A family of protein-deglutamylating enzymes associated with neurodegeneration. *Cell* **143**, 564-578 (2010).

**Acknowledgements:**

We would like to dedicate this manuscript to Dr Hector Barra, father of the de/tyrosination cycle who passed away on 2<sup>nd</sup> december 2016. We are grateful to D. Job who strongly supported initiation of the project and for his constant encouragements. We thank M. Comte, E. Martin, C. Corrao, and C. Paoli for technical assistance. We thank members of the PIC-GIN platform for their help in cell imaging and zootechnicians of the Grenoble Institut des Neurosciences for animal care. We thank M. Steinmetz for providing purified TTL, A. Beghin for initial development of AutoNeuriteJ macro. We thank the support of the discovery platform and informatics group at EDyP.

This work was supported by INSERM, CEA, University Grenoble Alpes, CNRS, and by La Ligue Contre le Cancer comités de l'Isère et de Savoie (to MJM), Association pour la Recherche sur le Cancer (SFI20111204053 to MJM; DOC20120605000 to AB; 20151203348 to LL), Fondation pour la Recherche Médicale FDT20160435356 (to CA), ANR-13-JSV2-0002/TYRTUB (to KR), INCA 2016-165 (to LL) and the National Institutes of Health grant R01 EB005011 (to MB). Proteomic experiments were partly supported by the ProFi grant (ANR-10-INBS-08-01).

A patent untitled "Methods and pharmaceutical compositions for treating tubulin carboxypeptidases associated diseases" has been filed by Inserm and UGA.

Data described can be found in the main figures, supplementary materials and auxiliary table.

**Supplementary materials:**

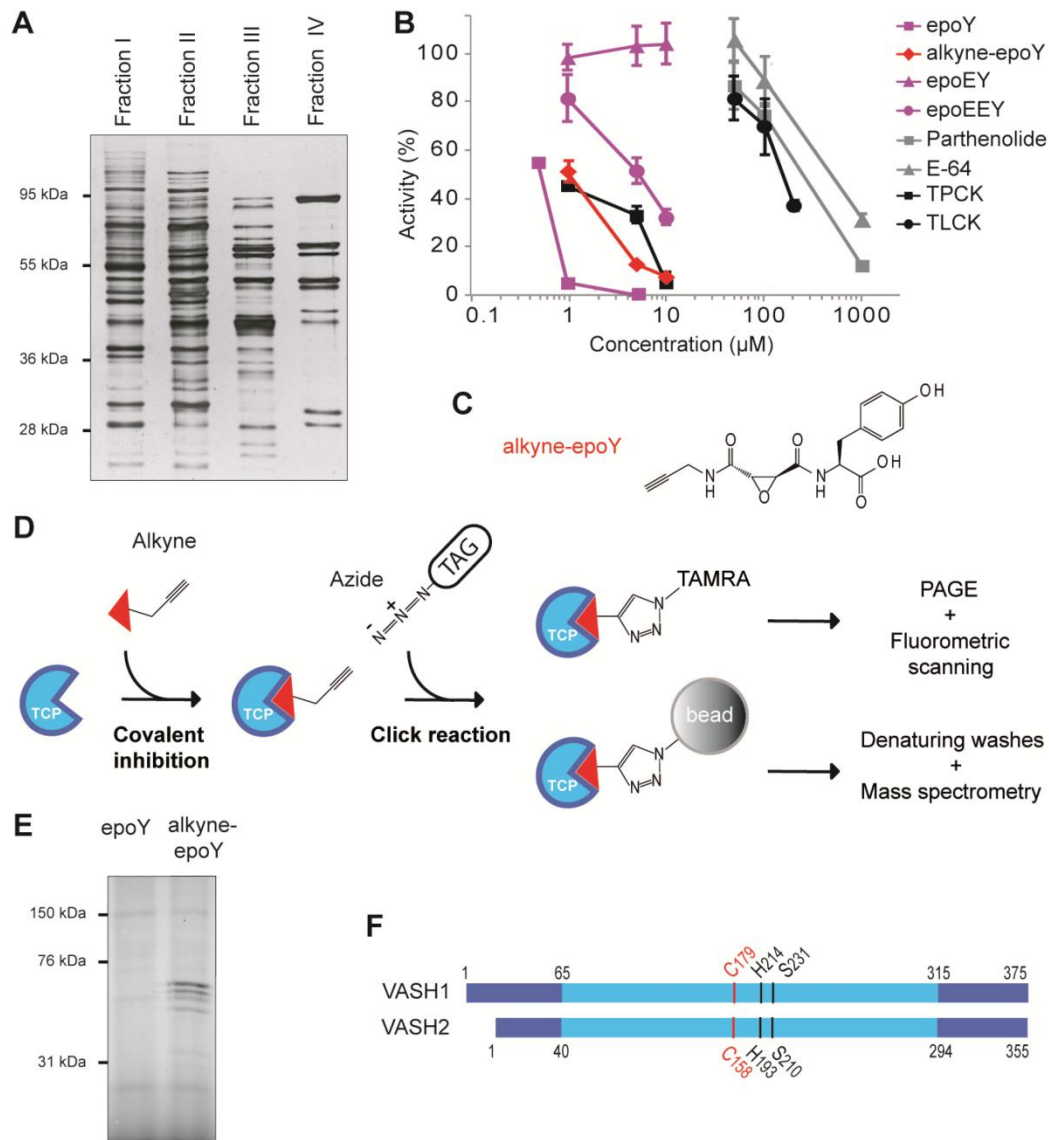
Materials and Methods

Author contributions

Figs S1 to S7

Table S1

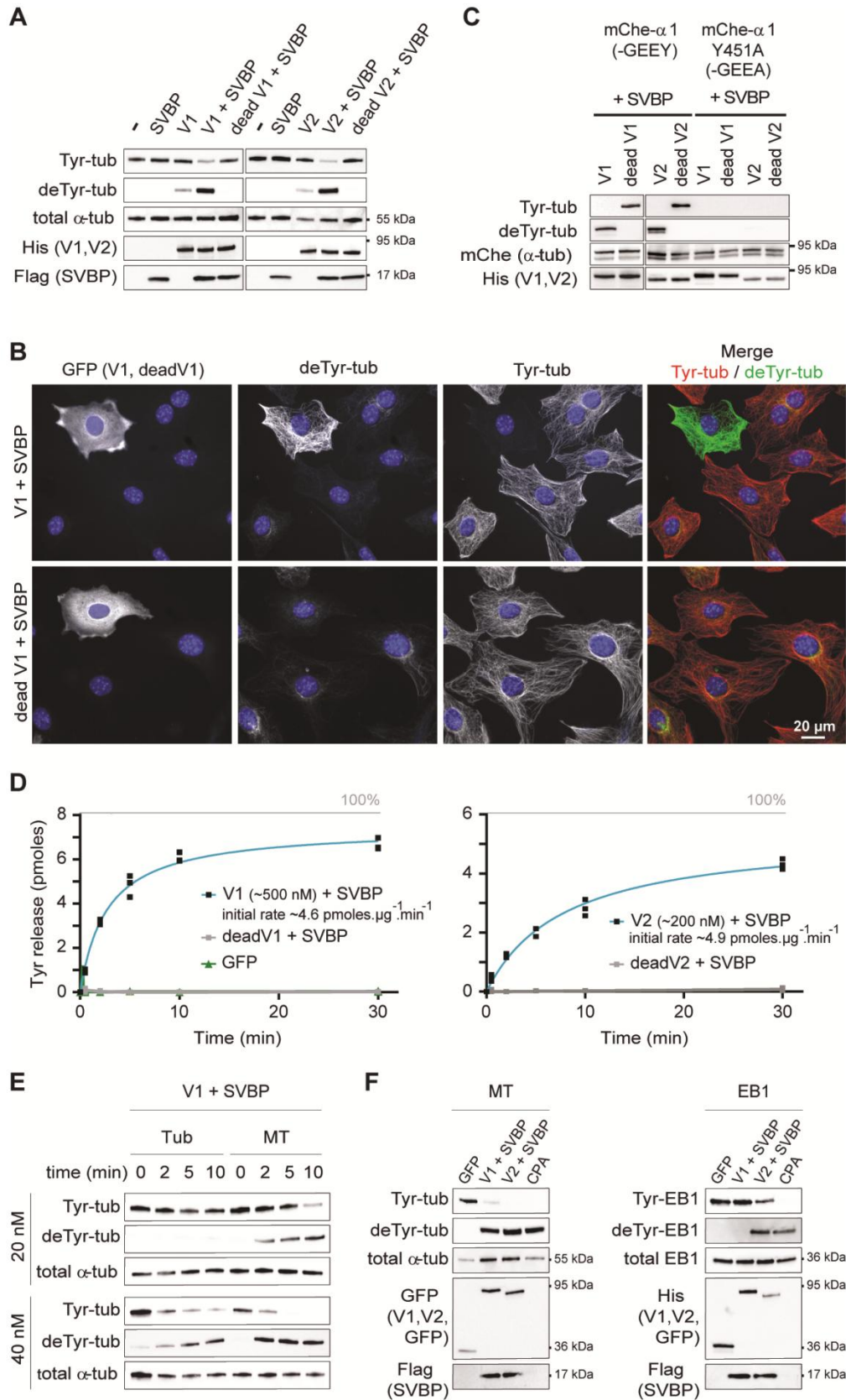
References (28-37)



**Fig. 1. Purification and identification of mouse brain TCP.** (A) SDS-PAGE (silver staining) of the indicated fractions of TCP enrichment from mouse brain (1  $\mu\text{g}$  of proteins): ammonium sulfate precipitation step followed by two ion exchange columns stages (Fig. S1A). (B) Fraction IV sensitivity to inhibitors. TPCK (Tosyl phenylalanyl chloromethyl ketone), TLCK (Tosyl-L-lysyl Chloromethyl ketone): commercial serine/cysteine inhibitors containing either a Phe or a Lys residue. Fraction IV activity showed a 100-fold higher sensitivity to TPCK than to TLCK. E-64 is a natural product inhibitor of clan CA cysteine protease. EpoY, epoEY and epoEEY are designed inhibitors containing an epoxide group coupled with Y, EY or EEY amino-acids respectively. Alkyne-epoY is a clickable version of epoY. Results are expressed as percentage of enzyme activity

(radioactivity assay) in the control with DMSO (mean  $\pm$  SD, n = 3-6). **(C)** Structure of alkyne-epoY. **(D)** Schematic representation of the last steps of TCP identification using Cu-catalyze azide-alkyne cycloaddition (click reaction). **(E)** Labeling of putative TCP from fraction IV by TAMRA red-fluorescent dye using alkyne-epoY (non-clickable epoY is used as control). **(F)** Schematic representation of mouse vasohibin-1 and vasohibin-2 (69% overall sequence homology; 77% for core domains (clear blue boxes)). These putative transglutaminase-like cysteine peptidases contain an unconventional triad of catalytic residues (Cys, His, Ser).

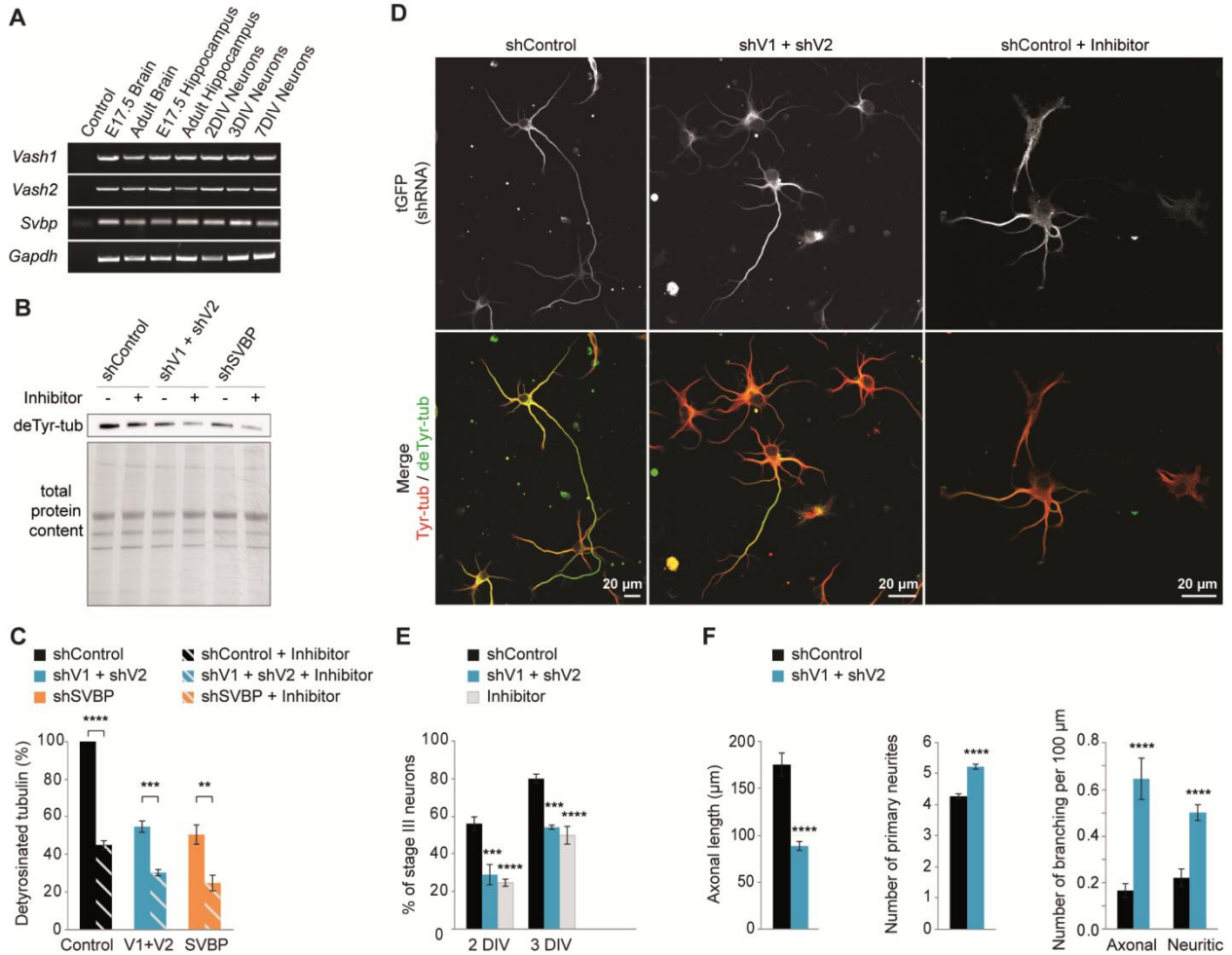




**Fig. 2. Vasohibins associated to SVBP are potent tubulin tyrosine carboxypeptidases. (A)**

Immunoblot of endogenous tubulin from HEK293T cells expressing each VASH (V1, V2) or their

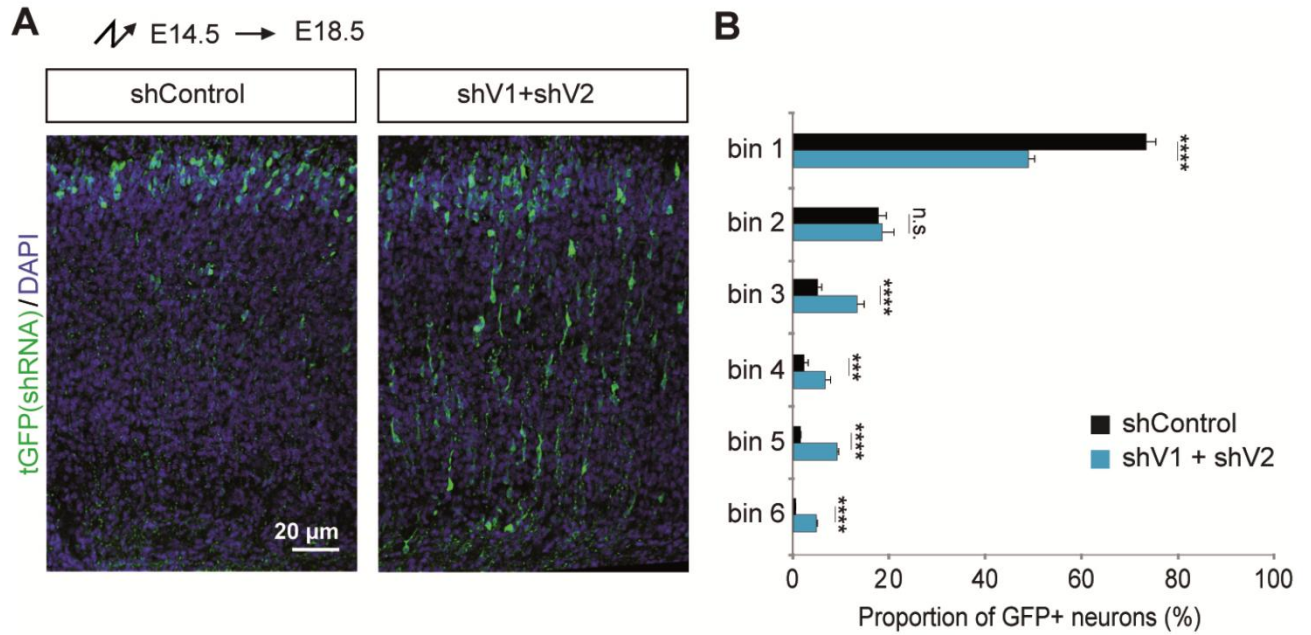
dead versions in the absence or presence of exogenous SVBP co-expression. Antibodies specific to tyrosinated and detyrosinated tubulin were used to assess detyrosination. Antibodies to  $\alpha$ -tubulin, His and Flag respectively reveal amounts of tubulin, vasohibin and SVBP. Non-transfected cells (-) show endogenous levels of tubulin modifications. **(B)** Immunofluorescence images of de/tyrosinated  $\alpha$ -tubulin pools from MEF cells expressing active or inactive VASH1, and SVBP. Vasohibins were probed with anti-GFP antibody. **(C)** Immunoblot of protein extracts from HEK293T cells expressing mCherry- $\alpha$ 1B-tubulin, each VASH and SVBP. Native or mutated versions of  $\alpha$ 1B-tubulin, respectively ending with EEY or EEA, were used. Levels of de/tyrosinated tubulin were measured as in (A). Antibody to mCherry demonstrates same amounts of exogenous  $\alpha$ -tubulin. **(D)** Detyrosination activity of purified VASH/SVBP complexes assessed using [ $^{14}$ C]-tyrosinated taxol-stabilized microtubules (6-8  $\mu$ M),  $n = 3$ . Active and catalytic dead versions of the vasohibins were coexpressed with SVBP in HEK293T cells and purified on cobalt resin (Fig. S4A). A purified GFP-His construct was used as a control. Data points were fitted with a single exponential (blue line). The theoretical maximal tyrosine release is indicated by a 100% line. **(E)** Detyrosination activity of purified VASH1/SVBP complexes (20 or 40 nM) on brain microtubules or tubulin dimers (5  $\mu$ M) assessed by immunoblot. We controlled that tubulin was in dimeric or in assembled form (Fig S4C) and that the same amounts of enzymatic complexes were present (Fig S4D). **(F)** Detyrosination activity of purified VASH/SVBP complexes (600 nM) on brain microtubules or recombinant GFP-EB1 (5  $\mu$ M). Note that enzyme quantities are much higher than in Fig. 2E. Carboxypeptidase A (CPA) was used as positive control. Antibodies against tyrosinated and detyrosinated EB1 were characterized in (15).



**Fig. 3. Down-regulation of VASH1 and VASH2 affects neuronal differentiation.** (A) *Vash1*, *Vash2* and *Svb* transcripts are found in brain tissues and hippocampal neurons. RT-PCR reactions of 45 cycles were performed, except for *Gapdh* for which only 25 cycles were performed. (B) Immunoblot analysis of the effect of VASH1 and VASH2 (shV1 + shV2) or SVBP (shSVBP) down-regulation with or without alkyne-epoY (inhibitor) on deTyrinated  $\alpha$ -tubulin levels in neurons. Neurons were transfected by electroporation with shRNAs associated to turboGFP (tGFP) cDNA just before plating and analyzed at 2DIV. Inhibitor (5  $\mu$ M) was added at 0DIV and at 1DIV. Results from duplicate immunoblots of three independent neuronal cultures. (C) Quantification of immunoblots as in B (duplicate of 4 to 8 independent neuronal cultures). Results are expressed as percentage of deTyrinated tubulin related to shControl (mean  $\pm$  SEM). DeTyrinated tubulin was significantly reduced in all conditions compared to shControl (One Way ANOVA with Sidak's

multiple comparisons test with \*\*\*\*  $p < 0.0001$ ). Detyrosinated tubulin was additionally reduced when shV1+shV2 and shSVBP transfected neurons were incubated with the inhibitor (Student t test). **(D-F)** Effect of vasohibins down-regulation on neurite outgrowth and axonal differentiation. Neurons were transfected as in B and analyzed by immunostaining at 2DIV and 3DIV. **(D)** Tyrosinated and detyrosinated  $\alpha$ -tubulin levels were imaged at 2DIV using the same antibodies as in Fig. 2A. Levels of shRNA were imaged using an anti-tGFP antibody. Note that size of scale bars are different. **(E)** Stage III neurons (bearing an axon) were counted manually on immunofluorescence images (generated as in C) from 4 to 10 independent cultures, at 2DIV and 3DIV. Proportion of stage III neurons (an index of neuronal differentiation) is represented as mean  $\pm$  SEM (One way ANOVA with Bonferroni multiple comparison test). **(F)** Morphometric analyses of at least 85 neurons (2DIV) using AutoNeuriteJ macro (see Materials and Methods for details) on immunofluorescence images generated as in D (mean  $\pm$  SEM, Mann-Whitney tests). \*  $p < 0.05$ , \*\*  $p < 0.01$ , \*\*\*  $p < 0.001$ , \*\*\*\*  $p < 0.0001$ .





**Fig. 4. Down-regulation of vasohibins affects radial migration of newborn cortical neurons.**

(A) Cortical coronal sections of E18.5 mice embryos electroporated at E14.5 with indicated shRNAs.

(B) Quantitative analysis showing the distribution of tGFP-positive neurons across the cortex divided into six bins of equal surface. Data from 5 brains per condition, 3 slides per embryo (at least 260 GFP<sup>+</sup>-neurons per embryo), mean ± SEM. n.s., not significant, \*\*\*p<0.001, \*\*\*\*<0.0001 (Mann-Whitney test).

# Discussion



## 11 Discussion et perspectives

Durant cette thèse, j'ai participé à la caractérisation du rôle de MAP6 dans la signalisation Sema3E. L'absence de MAP6, chez les souris, conduit à la disparition de la post-commissure du fornix dont la formation est en partie dépendante de la Sema3E. Nous avons montré que MAP6, de part son domaine PRD, est indispensable à la voie de signalisation attractive de cette molécule de guidage. Il semblerait que MAP6 soit impliquée dans la transduction de la signalisation attractive de la Sema3E, d'une part à travers son interaction avec le complexe tripartite de récepteurs à la Sema3E, et d'autre part avec des protéines à domaine SH2/SH3 comme Pi3K.

La recherche par analyse protéomique des partenaires de MAP6 a notamment permis l'identification des CRMP1, 2 et 4, déjà connues pour leur implication dans la signalisation Sema3A. Nous avons montré que dans la signalisation Sema3E affectant les neurones du subiculum, seule la présence de CRMP4 est nécessaire. Nous avons complété ces résultats par une étude histologique qui nous a permis d'observer que les souris KO CRMP4 présentent, elles aussi, une altération de la post-commissure du fornix. Cette altération se traduit par un retard de croissance aux stades embryonnaires et post-nataux, puis à l'âge adulte par une perte de densité de fibres au niveau du faisceau medial-cortico-hypothalamique ainsi qu'à proximité des corps mamillaires. Nous avons pu observer une aggravation de ces phénotypes lors du croisement des lignées KO MAP6, KO CRMP4 et KO Sema3E entre elles. Ceci renforce notre conviction de l'importance des fonctions conjointes de ces trois protéines dans l'établissement du fornix. J'ai également pu participer à l'étude par IRM des cerveaux de souris KO MAP6. Nous avons ainsi pu mettre en évidence de nouvelles altérations de leur neuro-anatomie tel que l'affaiblissement du faisceau pyramidal. Une étude histologique, nous a permis de confirmer ce défaut qui se traduit par une diminution de son volume sur toute sa longueur ainsi que par une forte défasciculation lors de son passage au niveau du noyau pontin. Pour finir, nos besoins récurrents au sein du laboratoire m'ont conduit à contribuer à la création d'une macro sous ImageJ permettant la quantification automatique de la morphométrie de cultures primaires de neurones.

Je vais maintenant discuter de la pertinence de ces résultats ainsi que des perspectives qui en découlent, en me concentrant plus particulièrement sur les résultats que j'ai produits, et certains points peu ou pas abordés dans les discussions des articles.

## 11.1 Rôle de MAP6 et CRMP4 dans la signalisation Sema3E

### 11.1.1 Interaction avec complexe tripartite

Les expériences de co-immunoprécipitation ont montré que MAP6 est capable d'interagir indépendamment avec chacun des membres du complexe tripartite de récepteurs (Neuropiline-1, pléxine-D1 et VEGFR2), nécessaires à la signalisation attractive de la Sema3E (Bellon et al., 2010). De plus, l'immunoprécipitation de MAP6 suffit à co-immunoprécipiter l'ensemble de ces membres, montrant ainsi la possibilité de formation de complexes composés de l'ensemble de ces protéines. Cependant la formation de ce complexe *in vivo* reste à prouver, ainsi que les mécanismes la régulant.

MAP6 peut être palmitoylée, ce qui lui permet d'être associée à des compartiments membranaires comme la membrane plasmique. L'importance de ces sites de palmitoylation de MAP6, dans la différenciation neuronale, a été démontrée (Tortosa et al., 2017). Les auteurs montrent d'ailleurs le rôle de la palmitoylation de MAP6 pour son enrichissement dans la partie distale de l'axone, durant la phase d'élongation axonale. Il est donc possible que cette palmitoylation puisse favoriser le maintien de l'interaction de MAP6 et du complexe tripartite en restreignant leur localisation dans des régions communes comme le cône de croissance.

La fonction de ces interactions est, elle aussi, encore à déterminer. En effet il serait intéressant d'évaluer l'impact de la transduction de la signalisation Sema3E, sur MAP6. Cette liaison de la Sema3E à son complexe de récepteurs induit-elle des modifications de l'interaction entre MAP6 et ce complexe? Ou bien induit-elle des modifications post-traductionnelles de MAP6? Ces deux événements, s'ils existent, sont-ils liés entre eux?

MAP6 est une phosphoprotéine possédant de nombreux domaines pouvant réguler son activité. Malheureusement, peu d'outils sont disponibles pour l'étude des phosphorylations de MAP6. Mis à part la CamKII, très peu de ces protéines régulatrices ont été identifiées et encore moins leurs sites de phosphorylation sur MAP6. Le développement de nouveaux outils, comme des anticorps spécifiques de sites de phosphorylation connus de MAP6, nous permettrait d'approfondir cette étude. Enfin, il est possible que MAP6 interagisse seulement avec le complexe de récepteurs pour maintenir d'autres acteurs de la signalisation (Pi3k, CRMP4) à proximité, sans pour autant qu'il soit nécessaire de réguler ces interactions de MAP6 pour permettre la transduction du signal Sema3E.

Il a été montré que CRMP4 est capable d'interagir avec les récepteurs neuropiline-1 et pléxine-A1 (Deo et al., 2004). Dans cette étude, les auteurs utilisent des cellules COS pour corréler des expériences de co-immunoprécipitation des CRMP avec ces récepteurs (Nrp-1 et Plx-A1), à l'induction de la contraction de ces cellules lors d'un traitement avec la Sema3A. Les expériences de co-immunoprécipitation montrent par ailleurs que CRMP4 lie mieux ces récepteurs en présence de Sema3A, mécanisme qui semble important dans la contraction cellulaire qu'elle induit.

Nos expériences préliminaires nous confirment que les récepteurs neuropiline-1 et pléxine-D1 co-immunoprécipitent avec CRMP4 (résultats non montrés). D'autre part, une construction de pléxine-D1 n'ayant plus de domaine cytoplasmique ne co-immunoprécipite plus avec CRMP4 laissant supposer un domaine important dans cette portion cytoplasmique de pléxine-D1 pour l'interaction ou pour la régulation de l'interaction avec CRMP4 (résultats non montrés).

L'effet de la Sema3E sur cette interaction reste à être défini, nous pouvons cependant spéculer que si la Sema3A favorise l'interaction de ses récepteur avec CRMP4 lors de sa signalisation répulsive, il est possible que la Sema3E inhibe au contraire cette interaction lors de sa signalisation attractive (Figure 25). Quel serait alors la fonction de cette inhibition? Peut-être servirait-elle à libérer CRMP4 de la membrane plasmique pour qu'elle puisse agir sur la modulation des dynamiques des cytosquelettes? Auquel cas MAP6 pourrait entrer en jeu dans ce mécanisme.

### 11.1.2 Domaines fonctionnels de MAP6 et CRMP4 dans la signalisation Sema3E

La caractérisation des domaines de MAP6 interagissant avec CRMP4 a permis de montrer l'importance de la région N-terminale de MAP6. Dans cette région nous avons pu déterminer la présence de deux domaines d'interaction. Tout d'abord, le domaine Mn1 qui est suffisant à interagir avec MAP6, mais pas indispensable. En effet, les expériences de pulldown nous montrent que MAP6, invalidée pour les domaines Mn, est toujours capable d'interagir avec CRMP4 (résultats non montrés). Nous n'avons jusqu'à présent pas pu déterminer avec précision le second domaine d'interaction. Cependant nous savons qu'il est présent en amont du domaine Mn1, parmi les 90 premiers acides aminés de la région N-terminale de MAP6. Ces mêmes expériences nous ont révélé que le fragment N-terminal de MAP6 invalidé du domaine PRD semble plus affiné pour CRMP4.

Les expériences de sauvetage ont montré que le domaine N-terminal de MAP6 est primordial à la signalisation attractive de la Sema3E. De plus, la réexpression de MAP6 invalidée de ses domaines Mn (1, 2 et 3) n'empêche pas de rétablir la signalisation attractive de la Sema3E alors que ce n'est pas le cas lors de la surexpression de MAP6 invalidée pour son domaine PRD (Deloulme et al., 2015). Comme MAP6 et CRMP4 sont toutes deux indispensables à la voie attractive de la Sema3E, nous pouvons nous demander quelle est l'importance de leur interaction dans la transduction du signal.

Tout d'abord, la suppression du domaine PRD, indispensable dans cette signalisation, semble renforcer la proportion d'interaction de CRMP4 avec la région N-terminale de MAP6. Nous pouvons donc supposer que ce serait plutôt l'inhibition de l'interaction entre MAP6 et CRMP4 qui permettrait la stimulation de la croissance axonale. Les protéines à domaine SH2/SH3 (Pi3k par exemple), recrutées au niveau du domaine PRD de MAP6, peuvent possiblement bloquer par encombrement stérique l'interaction entre CRMP4 et la région N-terminale de MAP6. D'autre part il est possible, qu'à l'instar de l'interaction des CRMP avec les microtubules (Yoshimura et al., 2005; Brot et al., 2014), l'interaction de CRMP4 avec MAP6 soit régulée par sa phosphorylation. Auquel cas le domaine PRD de MAP6 pourrait réguler la phosphorylation de CRMP4 par le recrutement de kinase comme Pi3k et ainsi défavoriser l'interaction CRMP4/MAP6. En effet, l'activité de Pi3k sur Akt conduit à l'inhibition de GSK3 $\beta$  (Figure 25), et donc possiblement à l'inhibition de la phosphorylation de CRMP4 (Cole et al., 2006).

Le domaine Mn1 est, lui, suffisant à interagir avec CRMP4. Mais son invalidation n'empêche pas de rétablir la signalisation Sema3E dans les expériences de sauvetage (Deloulme et al., 2015). Il faut tout d'abord remarquer que l'interprétation de l'importance de ce domaine d'interaction dans la voie Sema3E peut, ici, être biaisée par la présence d'un second domaine pouvant compenser le premier. Ce n'est pas le cas du domaine PRD, qui semble être un domaine régulateur des interactions entre CRMP4 et MAP6 et non un domaine de fixation.

Si le recrutement de kinases (comme Pi3k) via le domaine PRD de MAP6 permet, par la phosphorylation de CRMP4, de réguler toutes ses interactions avec MAP6 (Mn1 et région N-terminale 1/90), alors l'absence de Mn1 est possiblement compensée par le second domaine d'interaction. En revanche, l'absence du domaine PRD bloque, elle, toute signalisation régulant ces interactions, ce qui pourrait être la cause de l'inhibition de la stimulation de la croissance axonale par la Sema3E.

Enfin, nous ne pouvons exclure qu'Mn1 ne soit pas impliqué dans cette voie de signalisation. Auquel cas cette interaction pourrait entrer en jeu dans d'autres processus cellulaires comme la régulation, par compétition, de l'interaction entre MAP6 et les microtubules.

Des expériences de sauvetage avec des mutants de MAP6 n'interagissant plus avec CRMP4 nous permettraient de déterminer l'importance de ces interactions dans la signalisation Sema3E.

Nous savons que la signalisation attractive de la Sema3E, est permise par la transduction de son signal par le VEGFR2, qui va activer la phosphorylation de Akt et de GSk3 $\beta$  (Bellon et al., 2010) (Figure 25). Il est apparu que le premier des deux domaines PRD de MAP6 est crucial pour la stimulation de la croissance axonale induite par la Sema3E. Celui-ci a vraisemblablement pour fonction le recrutement de protéines à domaine SH2/SH3 telle que la Pi3 kinase dont le sous-domaine p85 interagit avec la région N-terminale de MAP6 (Deloulme et al., 2015). Pi3K étant connue pour sa capacité à phosphoryler Akt dans la régulation de la croissance axonale (Cosker and Eickholt, 2007).

Il serait intéressant de tester l'effet de la surexpression de MAP6 mutée pour son domaine PRD dans des neurones du subiculum KO MAP6 sur les niveaux de phosphorylation d'Akt. Cette phosphorylation est-elle alors bloquée par l'absence du domaine PRD de MAP6, au même titre que la stimulation de la croissance axonale?

En aval de cette voie de signalisation on retrouve les CRMP qui sont phosphorylées par GSK3 $\beta$  lorsque celle-ci n'est pas inhibée par Akt. Un anticorps spécifique de la forme phosphorylée de CRMP4 par GSK3 $\beta$  au niveau du résidu Thréonine<sup>509</sup> a été produit (Cole et al., 2006). Ainsi grâce à cet anticorps, l'étude en immunofluorescence des niveaux de phosphorylation de CRMP4, au niveau du cône de croissance de neurones du subiculum, suivant la présence ou non du domaine PRD de MAP6, apporterait de nouveaux éléments dans la compréhension des mécanismes permettant la transduction de la signalisation Sema3E.

La phosphorylation de CRMP2 par la GSK3 $\beta$ , inhibe sa capacité à lier les microtubules. De plus, la surexpression d'un mutant de CRMP2 mimant cette phosphorylation par GSK3 $\beta$ , diminue la vitesse de croissance axonale de neurones hippocampaux (Yoshimura et al., 2005). L'importance des domaines C-terminaux des CRMP, régulant la dynamique des cytosquelettes d'actine et de microtubules, dans la croissance neuritique a été montrée (Fukata et al., 2002; Khazaei et al., 2014; Tan et al., 2015; Cha et al., 2016). Cependant ces tests ont été réalisés sur la croissance neuritique « basale ». Ainsi aucun lien n'a été établi entre l'effet que peut avoir une molécule de guidage axonal sur la phosphorylation de CRMP4, et les conséquences de cette phosphorylation sur la dynamique des cytosquelettes et la croissance axonale.

Nous avons au laboratoire les outils techniques pour réaliser ces tests. Tout d'abord il serait très intéressant de déterminer, par des expériences de TIRF par exemple, quels sont les effets précis des CRMP, et de leurs phosphorylations, sur la dynamique des cytosquelettes. Nous pourrions par la suite nous intéresser aux possibles effets des CRMP sur le couplage des cytosquelettes de microtubules et d'actine.

Nous avons établi pour la première fois la spécificité d'action d'une CRMP dans la signalisation attractive de la Sema3E. La réalisation d'expériences de sauvetage avec une construction de CRMP4 mutée pour ses domaines d'interactions au cytosquelette, ou ses sites de phosphorylation par GSK3 $\beta$ , pourrait nous permettre d'évaluer pour la première fois l'importance de la modulation de la dynamique du cytosquelette par une CRMP dans une voie de signalisation dépendante des sémaphorines.



### 11.1.3 Spécificités d'action dans la voie de signalisation attractive de la Sema3E?

MAP6 joue un rôle fondamental dans la voie de signalisation Sema3E qui régule la guidance et la croissance axonale des neurones du subiculum. En revanche, les effets répulsifs de la Sema3E sur les neurones corticaux sont indépendants de MAP6 (Deloulme et al., 2015). Nous savons que la bi-fonctionnalité de la Sema3E est permise par l'unique expression du récepteur Plx-D1 dans le cas de son effet répulsif sur la croissance axonale, alors que son effet stimulateur n'est possible qu'en présence du complexe Nrp-1, VEGFR2 et Plx-D1 (Chauvet et al., 2007; Bellon et al., 2010). Cependant MAP6 est exprimée dans ces deux types neuronaux et semble capable d'interagir indépendamment avec chacun de ces récepteurs. Malgré cela, la transduction du signal par la pléxine-D1 ne recrute pas MAP6 dans la voie de signalisation répulsive. La signalisation répulsive de la Sema3E met en jeu l'inhibition de la Rho GTPase R-Ras sous la dépendance de l'activité GAP de la pléxine-D1 (Uesugi et al., 2009). Et c'est l'inhibition de R-Ras qui va induire le collapse de cônes de croissance par la déphosphorylation d'Akt ainsi que l'activation de GSK-3 $\beta$  (Ito et al., 2006). En revanche, l'inverse se produit lorsque MAP6 est impliquée dans la voie de signalisation attractive (phosphorylation d'Akt et inactivation de GSK-3 $\beta$ ) (Figure 25).

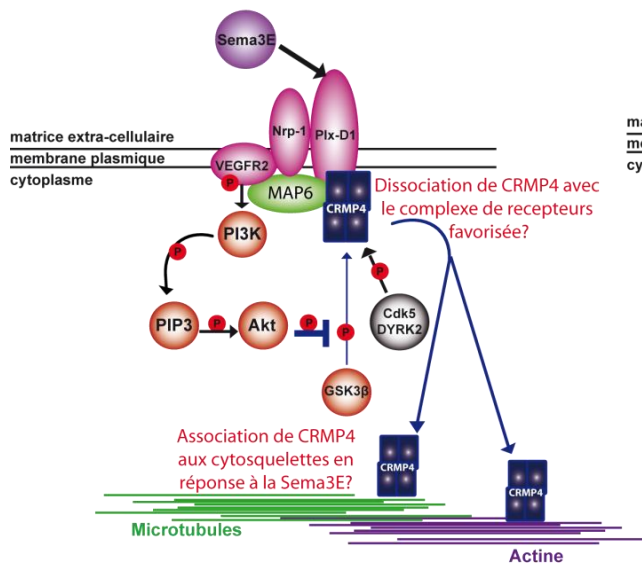
Il est possible que la transduction du signal par la pléxine-D1, dans la voie répulsive, n'ait d'effet que sur le recrutement de R-Ras et que seule la transduction par le VEGFR2 puisse recruter MAP6. De plus, un modèle proposé pour la fonction de la neuropiline-1 dans la signalisation attractive de la Sema3E, serait qu'elle inhibe la capacité de la pléxine-D1 à transduire le signal de la Sema3E (Bellon et al., 2010), permettant ainsi d'orienter la signalisation vers MAP6 plutôt que R-Ras. Enfin, on ne sait pas si les neurones subiculaires expriment R-Ras au court de l'embryogenèse ce qui pourrait expliquer le seul recrutement de MAP6 dans ce type neuronal.

CRMP4 est indispensable à la stimulation de la croissance axonale induite par la Sema3E. Il serait intéressant de tester les différentes CRMP dans la signalisation répulsive de la Sema3E. En effet, il est possible que ce ne soit pas les mêmes CRMP qui soient mises en jeu dans l'une ou l'autre des voies de signalisation induites par la Sema3E. Par exemple, la possibilité que les CRMP3 et 5 puissent être nécessaires à la signalisation répulsive, doublée du fait qu'elles ne semblent pas avec MAP6 *in vivo*, pourrait expliquer pourquoi MAP6 n'est pas impliquée dans la signalisation attractive.

Les phénotypes cellulaires observés lors de l'inhibition de l'expression des CRMP dans les neurones corticaux traités avec la Sema3E, pourront être corrélés à des phénotypes neuro-anatomiques chez les souris invalidées pour la CRMP impliquée dans la voie répulsive. En l'absence de Sema3E des phénotypes neuro-anatomiques imputables à la voie de signalisation répulsive ont déjà été identifiés. Par exemple, l'élargissement de la commissure antérieure, ou du faisceau striato-nigral en l'absence de cette molécule de guidage (Chauvet et al., 2007; Ehrman et al., 2013; Burk et al., 2017) pourront servir de base de comparaison avec les souris invalidées pour la CRMP impliquée dans cette voie de signalisation répulsive.

Dans l'éventualité où CRMP4 entre aussi en jeu dans la signalisation répulsive de la Sema3E, il faudra alors de nouveau étudier la régulation de ses phosphorylations en fonction du type neuronal (cortical ou subiculaire) ce qui pourrait permettre d'établir un modèle de la régulation de CRMP4 en fonction de la voie de signalisation impliquée. En effet, la phosphorylation des CRMP par GSK3 $\beta$  est sous la dépendance de kinases initiatrices ("priming kinases"), et il a été montré que ces kinases ont des actions préférentielles sur certaines CRMP (Cole et al., 2006; Tanaka et al., 2012). Par exemple, DYRK2 va plutôt phosphoryler CRMP4 alors que CDK5 aura une action préférentielle sur CRMP2. La régulation de ces kinases initiatrices pourrait elle aussi être impliquée dans l'orientation attractive ou répulsive de la signalisation Sema3E.

## Signalisation attractive de la Sema3E



## Signalisation répulsive de la Sema3E

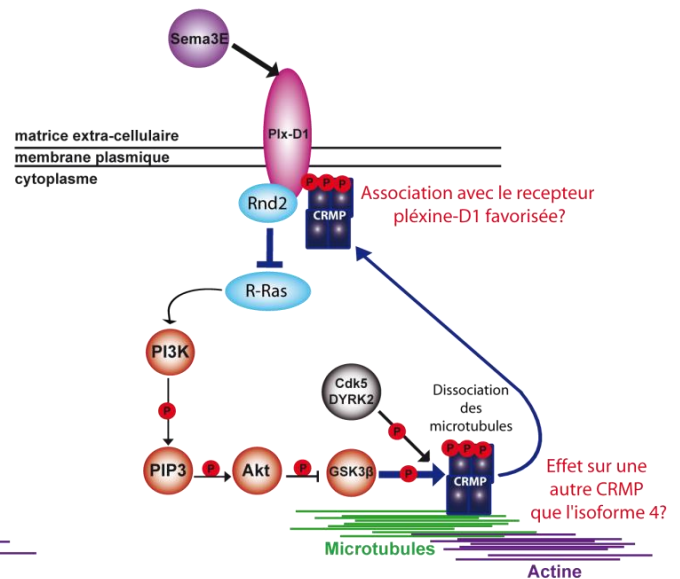


Figure 25 : Schéma récapitulatif des signalisations attractive et répulsive de la Sema3E.

En présence du complexe tripartite (Nrp-1, Plx-D1 et VEGFR2), la liaison de la Sema3E à la Plx-D1 va stimuler la phosphorylation d'Akt sous la dépendance de MAP6. En présence de Plx-D1 uniquement, la liaison de la Sema3E sur ce récepteur va induire une inhibition de R-Ras ainsi que de la phosphorylation d'Akt.

Les conséquences de ces signalisations Sema3E sur les CRMP sont encore inconnues, c'est pourquoi des hypothèses sont avancées en rouge.

## 11.2 Phénotypes et différences entre les lignées de souris MAP6, Sema3E et CRMP4 KO.

### 11.2.1 MAP6 est-elle uniquement nécessaire à la signalisation Sema3E?

Dans cette étude nous avons montré qu'en l'absence de MAP6, la Sema3E n'est plus capable de stimuler la croissance des neurones du subiculum. L'abolition de cette voie de signalisation chez les souris KO Sema3E conduit à un retard de croissance du fornix à E17.5, aboutissant à un amincissement de ce faisceau à l'âge adulte (Chauvet et al., 2007). L'analyse approfondie des phénotypes neuro-anatomiques des souris KO CRMP4, KO MAP6 ou KO Sema3E, en particulier au niveau du fornix a conduit à l'observation de phénotypes ainsi que de différences entre ces lignées de souris.

Les souris KO MAP6 présentent un phénotype plus sévère que les souris KO Sema3E ou CRMP4 puisqu'il se caractérise par l'absence complète de leur fornix post-commissural (Deloulme et al., 2015). Il semble donc qu'outre la fonction de MAP6 dans cette signalisation attractive dépendante de la Sema3E, celle-ci soit impliquée dans d'autres mécanismes de régulation de la croissance axonale. Deux possibilités peuvent être envisagées.

D'une part MAP6 pourrait être indispensable à la transduction d'une ou plusieurs autres voies de signalisation contrôlant la croissance du fornix. Par exemple, il est possible que MAP6 soit impliquée dans les signalisations induites par la draxine ou la Sema6A dont l'absence cause aussi des altérations de la post-commissure du fornix. Cette hypothèse est renforcée par le fait que le faisceau pyramidal des souris KO MAP6 est altéré alors que la Sema3E n'a pas été identifiée comme intervenant dans sa formation (Welniarz et al., 2017).

D'autre part il est possible que MAP6 puisse influencer la croissance axonale indépendamment d'une signalisation de guidage axonal. Par exemple, les capacités de MAP6 à stabiliser les microtubules ainsi qu'à lier l'actine à travers ses domaines Mn et Mc ont été testées et ne sont pas impliquées dans la stimulation de la croissance axonale induite par la Sema3E. Cependant nous savons que les domaines Mc perturbent la vitesse de croissance basale des neurones du subiculum. Il est donc possible qu'en dépit du fait que ces domaines n'entrent pas en jeu dans la signalisation Sema3E, leur absence puisse affecter la croissance normale du fornix et/ou d'autres faisceaux neuronaux.

#### **11.2.2 L'implication de CRMP4 dans d'autres signalisations que la Sema3E peut-elle expliquer les phénotypes neuro-anatomiques des souris KO CRMP4?**

Nous n'avons pas retrouvé le retard de croissance du fornix à P0, observé en l'absence de CRMP4, chez les souris KO Sema3E alors que ce retard avait été montré à E17.5 (Chauvet et al., 2007). Cependant, une très forte défasciculation a été observée chez ces dernières. Deux hypothèses pourraient expliquer ces observations, soit ce retard à E17.5 a pu être rattrapé à P0, soit la forte défasciculation du fornix observée à P0 était déjà présente à E17.5 empêchant la détection des fibres post-commissurales par les méthodes histologiques classiques. La défasciculation observée chez les souris KO Sema3E à P0 a également été observée chez les souris KO CRMP4 bien que dans une plus faible mesure. De plus, on observe une diminution de la surface de fibres post-commissurales à l'âge adulte aussi bien chez les souris KO Sema3E que KO CRMP4. Cette phénocopie partielle renforce les résultats obtenus sur les cultures de neurones du subiculum qui impliquent CRMP4 dans la voie Sema3E. Il est néanmoins probable que CRMP4 soit aussi impliquée dans d'autres signalisations de molécules de guidage axonal nécessaires à la croissance du fornix. Parmi les candidats, nous pouvons envisager la Sema3A. En effet, CRMP4 a déjà été impliquée dans la signalisation induite par cette sémaphorine (Alabed et al., 2007; Niisato et al., 2011).

De plus, cette sémaphorine a un effet répulsif sur les neurones hippocampaux (Chauvet et al., 2007). Une altération de la signalisation de ces neurones, ayant une partie du trajet de leurs projections axonales en commun avec les neurones du subiculum (jusqu'au niveau de la fimbria), pourrait affecter la croissance de ces derniers. Cette hypothèse est renforcée par le fait que la Sema3E est principalement sécrétée par les neurones de la CA1 et CA3. La croissance de ces neurones va possiblement attirer les projections axonales de neurones subiculaires en jouant pour eux un rôle d'axones pionniers jusqu'à la fimbria.

Par ailleurs, la Sema3A entre en jeu dans l'initiation de la croissance des neurones pyramidaux de la cinquième couche corticale formant le faisceau pyramidal (Welniarz et al., 2017). Le rôle de CRMP4 dans cette signalisation serait en accord avec nos résultats préliminaires qui semblent montrer un faisceau pyramidal défectueux chez les KO CRMP4.

### 11.2.3 **Quelles sont les conséquences comportementales de l'altération du fornix?**

Très peu d'études comportementales ont été réalisées chez les souris KO Sema3E et KO CRMP4, ce qui limite les connaissances de l'impact de leur défaut neuro-anatomique. Les troubles comportementaux des souris KO MAP6 semblent toutefois plus prononcés que ceux des souris KO Sema3E et KO CRMP4. Nous pourrions donc associer ceci à l'atteinte plus sévère de la neuro-anatomie des souris KO MAP6.

Certains troubles comportementaux diffèrent entre ces lignées de souris. Par exemple, les souris KO MAP6 et Sema3E ont toutes deux des défauts de mémoire spatiale. Par contre les souris KO MAP6 ont une anxiété supérieure à la normale (Andrieux et al., 2002) alors que c'est l'inverse chez les souris KO Sema3E (Chauvet et al., 2007). Encore une fois il n'est pas exclu que l'atteinte plus sévère des souris KO MAP6 puisse expliquer ces différences. Dans le cas des souris KO CRMP4, très peu d'études comportementales ont été menées jusqu'à présent (détails au chapitre 8.4). Il serait donc important de corréliser les défauts de formation du fornix de ces souris aux troubles comportementaux possiblement associés à ce circuit comme la mémorisation, le stress ou la motivation (détails au chapitre 6.1.3).

Il serait aussi intéressant d'étudier quelle part des troubles comportementaux des souris KO MAP6 est réellement imputable à l'absence de la post-commissure du fornix. En effet, aux vues des nombreuses altérations neuro-anatomiques et des nombreux troubles comportementaux des souris KO MAP6, il est très difficile d'associer un défaut structural à une fonction comportementale. La plupart des études sur les fonctions du fornix ont été réalisées sur la base de lésions chirurgicales de la post-commissure du fornix ou chimiques du subiculum. Cependant, ce type d'intervention a des conséquences neuro-anatomiques non retrouvées chez les souris KO MAP6. Par exemple, ces lésions induisent une diminution du volume des corps mamillaires alors que ce n'est pas le cas chez les souris KO MAP6. D'ailleurs, les conséquences comportementales de la lésion du fornix, en particulier sur la mémorisation spatiale, sont controversées du fait qu'il est possible que ces conséquences soient induites par l'altération des corps mamillaires et du faisceau mammillo-thalamique (MTT) causée par les lésions chirurgicales (Vann and Aggleton, 2003; Vann et al., 2011). Chez les souris KO MAP6, la post-commissure du fornix est absente sans apparente altération des corps mamillaires ainsi que du MTT, possiblement grâce à la mise en place de phénomènes neuro-développementaux compensatoires de l'absence des afférences du fornix. Ces souris présentent quand même des problèmes de mémorisation spatiale (Bouvrais-Veret et al., 2007; Bégou et al., 2008). Etant donné l'ampleur des altérations anatomiques des cerveaux des souris KO MAP6, il ne peut pas être exclu que ce trouble de mémorisation spatiale soit causé par l'altération d'une autre structure. Grâce à l'électroporation *in utero*, peut-être est-il possible de réintroduire MAP6 dans la région hippocampale de souris KO MAP6 pendant leur développement embryonnaire, et ainsi de rétablir partiellement la formation de la post-commissure du fornix sans affecter les autres défauts neuro-anatomiques. Auquel cas, la comparaison de ces souris avec des souris KO MAP6 et des souris WT pourrait apporter de nouvelles indications sur les fonctions spécifiques de ce faisceau.



## 11.3 IRM

### 11.3.1 Limites et complémentarité avec l'histologie.

Les observations réalisées en IRM, sont obtenues par le calcul de variations de paramètres physiques comme par exemple la direction de résonance de molécules d'eau. Un challenge dans ce champ d'investigation est donc de corréliser ces mesures avec la réalité fonctionnelle ou structurale de l'organe que l'on observe (Sanders, 2009). Cette validation peut être apportée par l'histologie ou la transparençation des cerveaux. Le DTI ne mesurant que l'orientation des fibres, l'appartenance de fibres à un faisceau d'axone est déterminée uniquement sur le critère de l'uniformité de l'orientation de ces fibres au sein du faisceau. Cette uniformité n'est malheureusement pas toujours présente *in vivo*, où les faisceaux peuvent se croiser, fusionner ou se dissocier. En revanche cette stratégie permet l'observation de n'importe quel faisceau suffisamment gros sans besoin de marquage spécifique. C'est un grand avantage par rapport à la transparençation, qui nécessite un marquage suffisamment spécifique de la structure que l'on veut étudier (immunomarquage, expression endogène de fluorochrome, Dye) limitant grandement son utilisation.

La taille des cerveaux de souris est aussi une limite à l'utilisation de l'IRM. En effet la faible résolution spatiale de cette technique (voxels d'environ  $100\mu\text{m}^3$ ) limite l'observation de certains tracts trop fins. Ce problème a été rencontré lors de l'étude du faisceau pyramidal qui, en passant au niveau du noyau pontin, se défascicule en plusieurs faisceaux plus fins avant de se re-fasciculer plus distalement en un seul faisceau dans le bulbe rachidien. Par l'observation microscopique de coupes histologiques ou de cerveaux transparençés nous pouvons clairement suivre ce type d'événement, même chez les souris KO MAP6 où cette défasciculation est très prononcée. A l'inverse, en DTI-3D le suivi de ce faisceau quelque soit la direction (proximo-distal ou disto-proximal), conduit chez les KO MAP6 à l'interprétation d'une rupture du faisceau au niveau du noyau pontin du fait de l'impossibilité d'interpréter la défasciculation à ce niveau. Il est surprenant que ce soit cette limite résolutive du DTI qui nous ait conduit à l'identification de ce défaut. Ainsi grâce à cette technique nous avons pu déterminer la localisation du défaut mais pas sa nature, qui a été révélée par l'histologie, ce qui démontre la complémentarité de ces deux techniques.

En conclusion, les techniques de transparençation de tissus sont un bon moyen de compléter voir de valider des mesures IRM puisque elles permettent d'observer des épaisseurs de tissus compatibles avec l'IRM, tout en offrant une bien meilleure résolution pour des temps d'acquisition plus court. L'utilisation de l'IRM permet en revanche d'avoir une vision plus globale de la neuro-anatomie qu'en histologie, du fait de l'absence de limitation due aux marquages spécifiques.

## **11.4 Quantification automatique de l'arborisation de neurones en cultures par la macro AutoNeuriteJ.**

### **11.4.1 Problématique d'analyse morphologique de neurones en culture.**

Une problématique majeure dans l'analyse de paramètres morphologiques de cellules en culture, et en particulier pour les neurones, est inhérente à la grande variabilité morphologique de ces cellules. En effet, la diversité des types neuronaux même au sein d'une petite région cérébrale mise en culture, ainsi que le caractère aléatoire de l'organisation de ces neurones lorsqu'ils sont isolés, conduit à cette grande variabilité. Ceci oblige l'expérimentateur à choisir une stratégie pour obtenir une quantification fiable d'un paramètre morphologique observé sur une culture de neurones. Il peut soit opter pour la quantification d'un grand nombre de neurones obtenant ainsi une meilleure représentativité d'une population, soit opter pour la sélection préalable d'une plus petite quantité de neurones en fonction de critères prédéterminés (niveau de différenciation, densité de l'arborisation...) augmentant ainsi la représentativité d'une sous-population choisie. Dans les deux cas, de nouvelles contraintes s'imposent : une contrainte évidente de temps, si on opte pour la première stratégie; et le risque de passer à coté de phénotypes exclus par l'expérimentateur, si on opte pour la seconde.

### 11.4.2 Avantages et inconvénients d'AutoNeuriteJ

Les quantifications manuelles sont grandement dépendantes de l'expérimentateur. Cependant elles sont aussi variables chez un même expérimentateur (Cai et al., 2011). L'automatisation d'une quantification présente l'avantage d'une bien meilleure reproductibilité. De plus, cette reproductibilité permet de s'affranchir de certains biais inhérents à l'automatisation. En effet quelque soit l'erreur que puisse faire une macro lors d'une prise de décision, par rapport à ce que l'expérimentateur déciderait, cette erreur sera reproduite systématiquement pour tout échantillon analysé normalisant ainsi son impact.

AutoNeuriteJ quantifie d'emblée un ensemble de paramètres morphométriques. Ainsi, si on veut sélectionner une sous-population d'un échantillon sur la base d'un de ces paramètres (par exemple les neurones suffisamment différenciés pour avoir un axone) on peut le faire à *posteriori* de la quantification sur le tableur Excel. De cette manière, la macro permet de réaliser beaucoup d'analyses différentes à partir d'un seul jeu de données relativement complet.

Le fait de programmer une analyse automatique, comme celle de la morphométrie d'une culture de neurones, permet d'augmenter grandement sa rapidité. Cependant même si nous sommes ainsi tentés d'augmenter la taille d'échantillonnage (nombre de neurones mesurés) au sein d'une seule expérience pour augmenter la précision de notre observation, il faut garder à l'esprit que cela n'augmente en rien la puissance de la comparaison statistique qui en découle. Par contre, cette augmentation va diminuer grandement l'estimation de la valeur  $p$ , conduisant à la détection de différences très subtiles avec de très faible valeur "p".

En conclusion, le temps gagné par l'automatisation ne devrait pas être uniquement investi dans l'augmentation de la taille des échantillons analysés, mais aussi dans le nombre d'expériences indépendantes réalisées s'il y a besoin d'augmenter la puissance du test, sinon dans l'analyse de nouvelles expériences pouvant apporter des informations complémentaires.

### 11.4.3 Améliorations à apporter

La difficulté majeure pour l'analyse morphométrique de neurones en culture est d'arriver à distinguer les neurites de deux neurones ayant établi des contacts ou des croisements entre eux. Certains laboratoires développant ce type de logiciel commencent à proposer des solutions pour la segmentation automatisée de ces neurones connectés basées sur l'orientation entre les neurites entrants et sortants d'un croisement (Ong et al., 2016). Cependant aucune solution n'existe lorsque les neurites se croisent, adhèrent l'un à l'autre et poussent conjointement dans une même direction. Nous avons opté pour la solution, plus simple, de ne quantifier que les neurones isolés, ce qui nous oblige à réaliser des cultures peu denses de neurones.

Nos compétences informatiques ne nous ont pas permis de coder AutoNeuriteJ dans un autre langage que celui simplifié d'ImageJ. Ceci peut-être regrettable du fait de la rapidité de calcul que permettent les langages compilés tels que JAVA. Des améliorations sont donc possibles de ce point de vue, sachant que l'analyse d'environ un millier de neurones dure environ 1 à 2 heures avec notre version.

## 12 Conclusion générale

La complexité et la diversité des mécanismes régulant la croissance axonale rendent d'autant plus compliquée l'étude de l'établissement de connectivités neuronales. Durant cette thèse, j'ai pu participer à l'approfondissement des connaissances d'une seule de ces nombreuses voies de signalisation en association à la formation d'un faisceau d'axones, le fornix. On ne peut nier l'ampleur du travail restant à réaliser avant de comprendre les séquences régulatrices du guidage axonal dans leur globalité. Mais la recherche scientifique est ainsi, et seuls les apports individuels d'une petite pierre à l'édifice ont pu nous conduire à la construction des solides bases de connaissances dont nous disposons aujourd'hui. Dans le domaine de la croissance axonale, ceci nous permet par exemple de nous rendre compte d'une certaine redondance des différentes voies de signalisation, qui aboutissent très souvent sur les mêmes messagers intracellulaires (comme les Rho GTPases), et qui à leur tour vont mettre en jeu les mêmes effecteurs (comme les cytosquelettes). En opposition, il est passionnant d'observer à quel point de subtils changements, comme l'expression ou le recrutement d'une seule protéine supplémentaire, peuvent régir la spécificité du guidage axonal. Je pense que l'identification de ces changements sera déterminante dans notre compréhension future de l'établissement des connectivités neuronales, puisque ce sont eux qui dirigent réellement l'agencement du cerveau. Dans le cas de la Sema3E, le mécanisme engendrant sa bi-fonctionnalité est compris depuis maintenant plus de 10 ans. Et pourtant nous découvrons encore de nouveaux messagers nécessaires à la transduction du message codant le choix d'attraction que prennent certains neurones qui répondent à cette molécule de guidage. Peut-être que nous serons un jour capable de reconstituer artificiellement l'ensemble d'une cascade de signalisation permettant la formation d'un faisceau d'axone... Pour en arriver là, il me semble crucial de pouvoir tester nos hypothèses sur la signalétique des neurones, aux fonctions neuro-développementales dont on suppose qu'elles jouent un rôle. En effet, ces tests me semblent indispensables à la démonstration de la véracité de nos hypothèses. Pour cela nous avons la chance, et même parfois le plaisir, d'avoir à notre disposition de nombreux outils d'imagerie de plus en plus adaptés à nos besoin d'observer, à la fois dans son ensemble mais aussi avec précision, l'anatomie du cerveau. Toutefois, j'aimerais conclure en insistant sur le fait que ces outils ne nous seraient d'aucune utilité sans les modèles animaux dont nous disposons, et à qui nous devons la grande majorité de nos découvertes.

## 13 Annexe

### 13.1 Macro AutoNeuriteJ

#### 13.1.1 Partie 1 : Création des images Individuelles des neurones et de leur squelette avant leur quantification.

*/\*///This macro was created by Anne BEGHIN, Eric DENARIER, Benoit BOULAN and Baptiste GALANT  
This was performed on (Fiji Is Just) ImageJ 1.51h version*

*This macro allow the selection of neurons to quantify the neurite arborescence from mosaic acquisitions (stitching of X20 objective image of a coverslip)  
It can proceeds several mosaic saved in different folders.*

*This macro requires in each folder :*  
3 images in this order (beware to the naming ) :  
A original image of neurons (e.g neurons.tif)  
A binary image of neurons (e.g neurons\_bin.tif)  
A binary image of nucleus (e.g nuclei.tif)

*Additional plugins to install in Fiji/plugins:  
The plugin "Analyze Skeleton 2D/3D" Developed by Ignacio Arganda-Carreras  
<http://imagej.net/AnalyzeSkeleton>  
the Morphology plugins from Gabriel Landini's website :  
<http://www.mecourse.com/landinig/software/software.html>*

*Additional file to install in Fiji/LUT:  
neurons.lut*

*It creates 6 stacks :*  
Neurones = Stack\_Neuron\_Original  
Binary Neurones = Stack\_Neuron  
Skeletonized = Stack\_Skelet  
Cell Body (a circle at the position of the nuclei enlarge to fit the cell body ) = Stack\_Body  
Skelet+Cell Body=Stack\_BodySkelet  
Skelet-Cell Body= Stack\_NobodySkelet

*and a ROIset corresponding to the selected neurons on the original image*

```
*/  
macro "AutoNeuriteJ [F1]" {  
  
    //////////////////////////////////// Some parameters to be tuned.  
  
    minNeurite=5; // Defines the minimal length to be a primary neurite tree if smaller it is erased from the skeleton  
    minNeuron=250; // Defines the minimal area to be a neuron if less the neuron is not considered  
    minLengthSkelet=25; // Defines the minimal length of a neuritic skeleton if smaller the neuron is not considered  
  
    Dialog.create("Parameter settings");  
    Dialog.addNumber("Minimal Area to be a Neuron",minNeuron);  
    Dialog.addNumber("Minimal size to be a primary Neurite",minNeurite);  
    Dialog.addNumber("Minimal skeleton length to consider a neuron",minLengthSkelet);  
    Dialog.show();  
  
    minNeuron=Dialog.getNumber();  
    minNeurite=Dialog.getNumber();  
    minLengthSkelet=Dialog.getNumber();  
  
    //////////////////////////////////// Records the time at start of the macro  
    getDateAndTime(year, month, dayOfWeek, dayOfMonth, hour0, minute0, second, msec);  
    setBatchMode(true);  
  
    ////////////////////////////////////stack opening  
    defaultValue=1;  
    nombre_condition=getNumber("How many conditions do you have to analyze?", defaultValue);
```



```

// Ask for the number of stack to be analysed
path=newArray(nombre_condition);
list=newArray(20);

for (e=0; e<nombre_condition; e++) { // Ask for the directory of each stack to be analysed.
    path[e] = getDirectory("Choose a Directory");
}
for (e=0; e<nombre_condition; e++) { // Files opening

list = getFileList(path[e]); titre_culture=File.getName(path[e]);

////////// Sets information about the cells that will not be considered
number_Neurons=0;
connected_neurons=0; // Sets the number of connected neurons that will be removed
SkelettooShort=0; // Sets the number of cells with too short skelet that will be removed

////////// Opens the original neurons image
open(path[e] + list[0]); run("Set Scale...", "distance=1"); rename("Originale"); title1=getTitle();
title2=File.nameWithoutExtension;

run("8-bit"); run("Set Scale...", "distance=1");
sauvegarde=File.directory();
File.makeDirectory(sauvegarde+"/r_"+title2);

////////// Opens the binary neurons image and removes on edges and less than minNeuron add to manager
open(path[e] + list[1]); run("Set Scale...", "distance=1"); rename("Binneurons"); title=getTitle(); run("Select None");
run("Analyze Particles...", "size="+minNeuron+"-Infinity show=Masks exclude add in_situ");

////////// Opens the binary nuclei image
open(path[e] + list[2]); run("Set Scale...", "distance=1");rename("Nuclei");title3=getTitle();

////////// Removes Neurons and nuclei when more or less than one nucleus per neuron
nROI=roiManager("Count");

for (i=0;i<nROI;i++){
    selectWindow("Nuclei");
    roiManager("Select", i); // selection of neurons in ROImanager
    run("Analyze Particles...", "size=0-Infinity summarize"); // counts number of nuclei in the neuron
}

selectWindow("Summary");
IJ.renameResults("Results");
selectWindow("Results");

for (i=0;i<nResults;i++){
count=getResult("Count",i);

    if (count!=1) { // Fills neurons and nuclei when 0 or more than 1 nucleus
connected_neurons=connected_neurons+count;
setForegroundColor(0, 0, 0);
selectWindow("Nuclei");roiManager("Select", i);run("Fill", "slice");run("Select None");
selectWindow("Binneurons");roiManager("Select", i);run("Fill", "slice");run("Select None");
}
}

selectWindow("Results"); run("Close");
roiManager("reset");

//////////and removes nuclei not in a neuron
imageCalculator("AND", "Nuclei", "Binneurons");

////////// Creates Image of cell bodies by dilating and opening the nuclei in neurons
run("BinaryConditionalDilate ", "mask=Binneurons seed=Nuclei iterations=10 create white");
run("Options...", "iterations=3 count=1 black do=Open");
run("BinaryConditionalDilate ", "mask=Dilated seed=Nuclei iterations=-1 white"); //removes small bodies after Opening
saveAs("tiff",sauvegarde+"/body_"+title3); rename("Bodies");

```

```

//////////////////// Add in ROIManager neurons with a single nucleus

selectWindow("Binneurons"); run("Analyze Particles...", "add");
number_Neurons=roiManager("count");

//////////////////// Create images of Neurons (Body-Skelet-BodySkelet-Original-Binarized-NoBodySkelet)

for(j=0;j<number_Neurons;j++){

    cutROI ("Originale",j);
    cutROI ("Bodies",j);
    cutROI("Binneurons",j);

    ////////////////////// "Neuron skeleton" images creation from the binarized image////////////////////
    run("Duplicate...", "title=BodSkele_"+j );
    run("Skeletonize");

    ////////////////////// "Body and skeleton" and "Skeleton without body" images creation from the binarized image////////////////////

    imageCalculator("Add", "BodSkele_"+j, "Bodies_"+j);
    imageCalculator("Subtract", "BodSkele_"+j, "Bodies_"+j, "create", "stack",
    "BodSkele_"+j, "Bodies_"+j); rename("NoBodySkelet_"+j);

    ////////////////////// Test if skelet is large enough in NoBodySkelet image //////////////////////

    run("Set Measurements...", "area shape limit redirect=None decimal=3");

    setAutoThreshold("Default dark");
    run("Measure");

    lengthSkelet=getResult("Area",0);
    run("Clear Results");

    if (lengthSkelet<= minLengthSkelet) { // If length skelet is too short
        selectWindow("Originale_"+j); close();
        selectWindow("Bodies_"+j); close();
        selectWindow("BodSkele_"+j); close();
        SkelettooShort=SkelettooShort+1;
    }

    ////////////////////// Removes loops in the neuron's skeleton //////////////////////
    // ////////////////////// We repeat the Skeleton Analysis if a loop is found
    else { // If length skelet is long enough
        mean=1;

        while (mean!=0) { mean=analyzeSkeleton("BodSkele_"+j,1);}

    // Detection of neurites extremities and subtraction to the skeleton to increase distances between extremities

        selectWindow("BodSkele_"+j); run("Duplicate...", "title=pointes2");
        run("BinaryConnectivity ", "white");
        setThreshold(2, 2); run("Convert to Mask");
        imageCalculator("Subtract", "BodSkele_"+j, "pointes2");
        selectWindow("pointes2"); close();

    //////////////////////
    mean=1;

        while (mean!=0) { mean=analyzeSkeleton("BodSkele_"+j,2);} }
        selectWindow("NoBodySkelet_"+j); close();

    // End else if lengthSkelet long enough
    call("java.lang.System.gc"); // Cleans the memory

    }

    // End of neuron number

```

```

roiManager("Deselect");
roiManager("Save", sauvegarde+"/r_"+title2+"/RoiSet.zip");
selectWindow("Results"); run("Close"); roiManager("reset");

print("min Primary Neurite Tree size: "+minNeurite+" min Neurons area : " + minNeuron+" min Total Skeleton size :
"+minLengthSkelet);
print("Neurons with a single nucleus: "+number_Neurons+" Number of connected Neurons : " + connected_neurons+"
Number of Skeleton too short : "+SkelettooShort);
selectWindow("Log"); saveAs("Text", sauvegarde+"/neurons count"); run("Close");
////////// Stack creation (Body-Skelet-BodySkelet-NoBodySkelet-Original-Binarized)
run("Images to Stack", "method=[Copy (center)] name=Stack_Neuron_Original title=Originale_ use");
run("Images to Stack", "method=[Copy (center)] name=Stack_Neuron title=Binneurons_ use");
run("Images to Stack", "method=[Copy (center)] name=Stack_Body title=Bodies_ use");
run("Images to Stack", "method=[Copy (center)] name=Stack_BodySkelet title=BodSkele_ use");
imageCalculator("Subtract create stack", "Stack_BodySkelet", "Stack_Body"); rename("Stack_NoBodySkelet");

// Additional Cleaning of short primary neurite < minNeurite
selectWindow("Stack_NoBodySkelet");
nbSlice=nSlices;

for (slice=1;slice<=nbSlice;slice++){
    selectWindow("Stack_NoBodySkelet");
    setSlice(slice);
    run("Analyze Particles...", "add");
    nROI=roiManager("Count");
    run("Set Measurements...", "area redirect=None decimal=3");

    for (i=0;i<nROI;i++){
        selectWindow("Stack_NoBodySkelet");setSlice(slice);
        roiManager("Select", i);
        run("Measure");
        areaNeurite=getResult("Area");
        run("Clear Results");

        if (areaNeurite<=minNeurite){
            setForegroundColor(0, 0, 0);

selectWindow("Stack_NoBodySkelet");setSlice(slice);roiManager("Select", i);run("Fill", "slice");

        }

        run("Select None");
    }
}

selectWindow("Stack_BodySkelet"); close();
imageCalculator("Add create stack", "Stack_Body", "Stack_NoBodySkelet"); rename
("Stack_BodySkelet");

////////// Saving and closure of stacks and ROI selections in a file named "resultat" created in the original image
path//////////
selectWindow("Stack_BodySkelet");run("Remove Overlay");
saveAs("tiff",sauvegarde+"/r_"+title2+"/Stack_BodySkelet"); close();

selectWindow("Stack_Body");
saveAs("tiff",sauvegarde+"/r_"+title2+"/Stack_Body"); close();

selectWindow("Stack_Neuron");run("Remove Overlay");
saveAs("tiff",sauvegarde+"/r_"+title2+"/Stack_Neuron_Bin"); close();

selectWindow("Stack_Neuron_Original");run("Remove Overlay");
saveAs("tiff",sauvegarde+"/r_"+title2+"/Stack_Neuron_Original"); close();

```

```

selectWindow("Stack_NoBodySkelet");run("Remove Overlay");
saveAs("tiff",sauvegarde+"/r_"+title2+"/Stack_NoBodySkelet"); close();

call("java.lang.System.gc");  /////Cleans the memory

selectWindow("Binneurons"); close();
selectWindow("Originale"); close();
selectWindow("Bodies"); close();
selectWindow("Nuclei"); close();
selectWindow("Results"); run("Close");

if (isOpen("Summary")){          selectWindow("Summary");close();}
run("Close All");
roiManager("reset");
}  /// End of number of conditions

//exit("fini !!!!");

///// Records time at the end of macro and prints the running time
getDateAndTime(year, month, dayOfWeek, dayOfMonth, hour1, minute1, second, msec);

hourSpent=hour1-hour0;
minSpent=minute1-minute0;
print ("programme ran for : "+hourSpent+"h"+minSpent+"min");

}

////////// Functions :////////////////////////

function cutROI (image,z) {
selectWindow(image);
roiManager("Select", z);
run("Duplicate...", "title="+image+"_"+z);getDimensions(width, height, channels, slices, frames);
setBackground(0, 0, 0); run("Clear Outside");run("Canvas Size...", "width="+width+2+" height="+height+2+"
position=Center");
}

function analyzeSkeleton (image,parameter)  {
selectWindow(image);
run("Duplicate...", "title=[duplicata]");
selectWindow(image);

if (parameter==1) run("Analyze Skeleton (2D/3D)",
"prune=[lowest intensity branch] original_image=Originale_"+j);
if (parameter==2) run("Analyze Skeleton (2D/3D)",
"prune=[shortest branch]");

imageCalculator("Subtract create", "duplicata",image);
selectWindow("Result of duplicata");
getStatistics(area, moy, min, max, std, histogram);
selectWindow("Result of duplicata"); close();
selectWindow("duplicata"); close();
if (isOpen("Tagged skeleton")){
selectWindow("Tagged skeleton");close();}

return moy;
}

```

### 13.1.2 Partie 2 : Quantification des paramètres morphométriques des neurones.

```
macro "AutoNeuriteJ_partII [F1]" {
```

```
////////// Different measures : neurone cell body expansion //////////  
//////////NB: the file selected must contain any other folders than those who will be analysed (presence of other  
files isn't important)////
```

```
//////////Parameters//////////
```

```
minAxon=50; // Minimal length to be an axon (pixels)  
minNeurite=5; // Minimal length to be a neurite (pixels)  
ratio=2; // Minimal ratio between (mean primary neurite length) and (axonal  
length)--> Minimal ratio to be an axon  
getDateAndTime(year, month, dayOfWeek, dayOfMonth, hour0, minute0, second, msec);
```

```
//////////stack opening
```

```
defaultValue=1;  
nombre_condition=getNumber("How many conditions do you have to analyze?", defaultValue);  
// Ask for the number of stack to be analysed  
path=newArray(nombre_condition);  
list=newArray(20);
```

```
Dialog.create("Parameter settings");  
Dialog.addNumber("Minimal size to be a Neurite",minNeurite);  
Dialog.addNumber("Minimal size to be an Axon",minAxon);  
Dialog.addNumber("Ratio (Axon Length)/(Mean Neurites length) to be an Axon",ratio);  
Dialog.show();  
minNeurite=Dialog.getNumber();  
minAxon=Dialog.getNumber();  
ratio=Dialog.getNumber();
```

```
for (e=0; e<nombre_condition; e++) { // Ask for the directory of each stack to be analysed.  
    path[e] = getDirectory("Choose a Directory");  
}
```

```
for (e=0; e<nombre_condition; e++) { // Files opening
```

```
////////// Sets information about the cells that will not be considered
```

```
number_Neurons=0;  
connected_neurons=0; // Sets the number of connected neurons that will be removed  
SkelettooShort=0; // Sets the number of cells with too short skelet that will be removed
```

```
setBatchMode(true);
```

```
//////
```

```
open(path[e] + "/Stack_Body.tif");rename("Stack_Body");  
open(path[e] + "/Stack_BodySkelet.tif"); rename("Stack_BodySkelet");  
open(path[e] + "/Stack_NoBodySkelet.tif");rename("Stack_NoBodySkelet");  
open(path[e] + "/Stack_Neuron_Original.tif");run("Enhance Contrast...", "saturated=0.3  
normalize process_all use");rename("Stack_Neuron_Originale");
```

```
setBackground(0, 0, 0);  
setForegroundColor(255, 255, 255);  
long_neurite=newArray(1000); type_neurite=newArray(1000);
```

```
////////// Prints Results Header //////////
```

```
getDateAndTime(year, month, dayOfWeek, dayOfMonth, hour1, minute1, second, msec);  
print (hour1+"h:"+minute1);  
print(path[e]);  
print("minAxon="+minAxon);
```

```

        print("minNeurite="+minNeurite);
        print("ratio="+ratio);
        print("Neurone \t Nb de primaires \t Ordre \t Moyenne des Primaires \t Longueur Neurite \t
Majeur \t Axone_total \t Branchements axonaux");
        run("Options...", "iterations=1 count=1 black do=Dilate stack");

////////// Loop for each neuron to create trees of neurite //////////
        nb_neurones=nSlices;
        q=1;
        for(j=1;j<=nb_neurones;j++){

                selectWindow("Stack_NoBodySkelet");    setSlice(j);                run("Duplicate...",
"title=masque_arbres"); // Neurites skeleton

                selectWindow("Stack_BodySkelet"); setSlice(j);    run("Duplicate...",
"title=pointes"); run("Duplicate...", "title=S_et_S"); // used to detect neurites extremities
                selectWindow("Stack_Body");    setSlice(j);    run("Duplicate...", "title=CBS");
                // Cell body of neuron number j

                selectWindow("pointes");
                run("BinaryConnectivity ", "white");
                setThreshold(2, 2); run("Convert to Mask");
                // Connectivity value correspond to ends of neurites
                run("Set Measurements...", " bounding redirect=None decimal=3");
                run("Analyze Particles...", "size=0-Infinity circularity=0.00-1.00 show=Nothing
display clear"); // Gives X and Y of each neurites end
                selectWindow("Results"); coordinates=getInfo();

                Nb_pointes =nResults;
                run("Clear Results");

////////// Search for each tree the longest branch without the ROI manager (too slow) //////////
                if(Nb_pointes==0){selectWindow("Stack_NoBodySkelet"); setSlice(j); run("Delete Slice");
                                selectWindow("Stack_BodySkelet");                setSlice(j);
run("Delete Slice");
                                selectWindow("Stack_Body");    setSlice(j);    run("Delete
Slice");
                                selectWindow("Stack_Neuron_Originale");    setSlice(j);
run("Delete Slice");
                                j=j-1;
                                nb_neurones=nb_neurones-1;
                                selectWindow("masque_arbres");close();
                                selectWindow("S_et_S");close();

                                selectWindow("pointes");close();
                                selectWindow("CBS");close();
                                }
                else{

                        grand_neurite = -1; neurite_majeur=-1;
                        for(i=0;i<Nb_pointes;i++) {
                                // for each ends

                                type_neurite[i]=2;
                                // Neurite type: 1=axon, 2=neurite (Default), 3...=secondary branch (or more)
                                selectWindow("S_et_S");
                                nom="Neurone_"+j+"_Neurite"+i+1;    run("Duplicate...", "title="+nom);
                                // Create one image by neurite
                                x=getCoordinate("BX", i); y=getCoordinate("BY", i);
                                // Coordinate of the ieme neurite end

```



```

        run ("Specify...", "width=2 height=2 x=" + x + " y=" + y + " centered");
        // Trace a pruning protection around the neurite end
setForegroundColor(255, 255, 255);
run("Fill", "slice");

        // Filling of the selected area, paved on the end
run("BinaryThin ", "kernel_a=[0 2 2 0 1 0 0 0 0 ] rotations=[rotate 45] iterations=-1 white"); // pruning
imageCalculator("AND", nom,"masque_arbres"); // Image of Neurone_j_Neurite_i
doWand(x, y,0.0,"8-connected");run("Clear Outside"); run("Fill", "slice"); run("Skeletonize");
        // Potential cleaning of other neurons

////////// Measure of the length of the neurite using Analyze Skeleton plugins
run("Analyze Skeleton (2D/3D)", "prune=none");
selectWindow("Results");
long_neurite[i]=getResult("Maximum Branch Length", 0); // Length between the nucleus and the end
close(); close("Tagged Skeleton");

if(long_neurite[i]>=neurite_majeur) { neurite_majeur=long_neurite[i]; grand_neurite=i;}
        // Record the longest neurite
    }

//*****Overlapping neurites Search*****
////////// Comparison between Neurite i and i+1

    for(i=0;i<Nb_pointes-1;i++) { // for each neurite i
        x=getCoordinate("BX", i); y=getCoordinate("BY", i); // Gets coordinates
        nom="Neurone_"+j+"_Neurite"+i+1; // Gets name
        for(k=i+1;k<Nb_pointes;k++) { // for each next neurite
            nom2="Neurone_"+j+"_Neurite"+k+1; // Gets name
            selectWindow(nom2); run("Select None");

            selectWindow(nom);run("Select None");doWand(x, y, 0.0, "8-connected"); // Selects Neurite i
selectWindow(nom2); run("Restore Selection"); // overlay of selected neurite i in the image neurite k
getStatistics(area, mean);overlap=mean; // measures overlap between the two neurites

if(overlap!=0) { // If overlap exists
if(long_neurite[i]>long_neurite[k]) { // if i length>k
type_neurite[k]=type_neurite[k]+1; // Increase k type of neurite
imageCalculator("Subtract ", nom2, nom); // reDraws k without overlap
}

else { // if k length>i
type_neurite[i]=type_neurite[i]+1; // Increase i type of neurite reDraws i without overlap
imageCalculator("Subtract ", nom, nom2); // reDraws i without overlap

} // end else

} // end if

overlap!=0

        } // end for(k=i+1;k<Nb_pointes;k++)
    } // End neurites apparies

////////// measure of neurite's length, and rank
grand=newArray(1000); MoyPrim=0 ; NbrPrim=0 ; NbrNeurite=0; LongPrim=0;
        // For mean length computation of primary
for(i=0;i<Nb_pointes;i++){ // for each neurite i
nom="Neurone_"+j+"_Neurite"+i+1;selectWindow(nom);
x=getCoordinate("BX", i); y=getCoordinate("BY", i);

```

```

run("Analyze Skeleton (2D/3D)", "prune=none");
area=getResult("Maximum Branch Length", 0);
grand[i]=getResult("Maximum Branch Length", 0);
close();
close("Tagged Skeleton");

if(i!= grand_neurite && area > minNeurite && type_neurite[i]==2){
    NbrPrim=NbrPrim+1;
    LongPrim=LongPrim+area;
    // Sum of primary segments, without the longest
MoyPrim=LongPrim/(NbrPrim); // Mean of primary segments, without the longest
    }
}

//////////////////////////////////Axon determination : potential axon vs major primary dendrite//////////////////////////////////

if(neurite_majeur> minAxon) type_neurite[grand_neurite]=1; // If the longest primary exceeds the minimal
length of axon, he is classed on axon.
    grand_primaire=1;
    for(i=0;i<Nb_pointes;i++){ // For each neurite i
        if(grand_primaire <= grand[i] && grand[i]>minNeurite && type_neurite[i]==2) { // If the primary
dendrite is longer than the repertory longest primary dendrite
            grand_primaire=grand[i]; // The primary becomes the longest repertory

            if(neurite_majeur< ratio*grand_primaire){
                // If the longest primary dendrite is not "ratio" times smaller than the primary longest neurite, this is
declassified after, of axon to dendrite
                type_neurite[grand_neurite]=2;
            }
        }
    }
    if(type_neurite[grand_neurite]<=2){ // If axon, added to primary neurites stats (number, total
length, mean length)
        NbrPrim=NbrPrim+1;

        LongPrim=LongPrim+neurite_majeur;
        MoyPrim=LongPrim/(NbrPrim);
    }

//////////////////////////////////Results writing//////////////////////////////////

for(i=0;i<Nb_pointes;i++){ // for each neurite i
    if(i != grand_neurite && grand[i]>minNeurite)
    print(j,"\t",NbrPrim, " \t ",type_neurite[i], "\t ",MoyPrim, "\t ", grand[i]);

    if(i == grand_neurite && grand[i]>minNeurite)
    print(j,"\t",NbrPrim, " \t ",type_neurite[i], "\t ",MoyPrim, "\t ", grand[i], "\t ", grand[i]); // Add of a column for
the longer primary neurite
}

//*****Image Stack creation corresponding to neurite skeleton, quantified by color in function
of their connections*****

selectWindow("masque_arbres");close();
selectWindow("S_et_S");close();
selectWindow("pointes");close();

```

```

selectWindow("CBS");close();

for(i=0;i<Nb_pointes;i++){ // For each end, we obtain the type of neurite (type_neurite), in a specific color

if (grand[i]<=minNeurite){ // If neurite too small, it is deleted of the stack Neurone_use
selectWindow("Neurone_"+j+"_Neurite"+i+1); close();
}

else {
selectWindow("Neurone_"+j+"_Neurite"+i+1);
run("Select None");getStatistics(area, mean, min, max, std, histogram);
if (mean!=0){
setThreshold(255, 255);
run("Create Selection");
setForegroundColor(type_neurite[i], type_neurite[i], type_neurite[i]);
run("Fill", "slice");
}
run("Select None");
}
}

//////////////////////////////////Test if their is several neurite to make a stack //////////////////////////////////

o=0;
for(i=0;i<Nb_pointes;i++){
if(isOpen("Neurone_"+j+"_Neurite"+i+1)){o++;}
}

i=0;

////////////////////////////////// Axonal Tree length //////////////////////////////////
if(o==0){
selectWindow("Stack_Neuron_Originale"); setSlice(q); run("Delete Slice");
selectWindow("Stack_Body"); setSlice(q); run("Delete Slice");

q=q-1;
}

if(o>=1){
if(o==1){// If one neurite
for(i=0;i<Nb_pointes;i++){
if(isOpen("Neurone_"+j+"_Neurite"+i+1)){
selectWindow("Neurone_"+j+"_Neurite"+i+1);
rename("MAX_Neuron_"+j);run("Duplicate...", "title=Axon_total");
} }
}

if(o>=2){ // If more than one neurite on the neuron j >> make a stack
run("Images to Stack", "name=Neuron_"+j+" title=Neurone_ use");
// Neurite stacks of one neuron
run("Z Project...", "projection=[Max Intensity]"); run("Duplicate...", "title=Axon_total");
// z projection of neurites on an unique image, and duplication
selectWindow("Neuron_"+j);close();
}

selectWindow("Axon_total");
run("8-bit");
run("Multiply...", "value=255");
x=getCoordinate("BX", grand_neurite); y=getCoordinate("BY", grand_neurite);doWand(x, y,
0.0, "8-connected"); // Selection of the longest main tree (axon and connection)
run("Clear Outside");

```

```

run("Analyze Skeleton (2D/3D)", "prune=none");
selectWindow("Results");
moy=getResult("Average Branch Length", 0);
n=getResult("# Branches", 0);
full_axon=moy*n;

close();
close("Tagged Skeleton");

selectWindow("Axon_total");
run("BinaryConnectivity ", "white");
setThreshold(2, 2); run("Convert to Mask");
run("Set Measurements...", " bounding redirect=None decimal=3");
run("Analyze Particles...", "size=0-Infinity circularity=0.00-1.00 show=Nothing display
clear");
Nb_branchement =nResults-2; // Compute number of branch in this tree

if(type_neurite[grand_neurite]==1){
print(j, "\t", "\t", "\t", "\t", "\t", "\t", "\t", full_axon, "\t", Nb_branchement); // Writing results
}

selectWindow("Axon_total");close();
selectWindow("MAX_Neuron_"+j);
run("neurons"); // Color type for the neurites

}
q++;

}} // Next Neuron

////////////////////////////////////Saving////////////////////////////////////
run("Images to Stack", "name=Stack_of_Neurones title=MAX use");

selectWindow("Stack_BodySkelet");close();
selectWindow("Stack_NoBodySkelet");close();

File.makeDirectory(path[e]+"/mesure");
selectWindow("Log");
saveAs("Text", path[e] +"/mesure/Mesure");
run("Close");

selectWindow("Stack_Body");run("neurons");
run("RGB Color");
selectWindow("Stack_of_Neurones");
run("RGB Color");
selectWindow("Stack_Neuron_Originale");
run("RGB Color");
imageCalculator("Transparent-zero create stack", "Stack_Neuron_Originale", "Stack_of_Neurones");
selectWindow("Result of Stack_Neuron_Originale"); rename("Overlay");

imageCalculator("Transparent-zero stack", "Overlay", "Stack_Body");
saveAs("tiff", path[e] +"/mesure/Overlay");close();
selectWindow("Stack_of_Neurones");
saveAs("tiff", path[e] +"/mesure/Stack_of_Neurones");
close(); close();

run("Clear Results");
run("Close All");

```

```

roiManager("reset");
if (isOpen("Summary")){          selectWindow("Summary");close();}
} // End of condition

getDateAndTime(year, month, dayOfWeek, dayOfMonth, hour1, minute1, second, msec);
minute0=hour0*60+minute0;
minute1=hour1*60+minute1;
totalTime=minute1-minute0;
print ("Macro AutoNeuriteJ ran for "+totalTime+" min");

} // End of Macro

//////////////////////////////////// Functions ::::::::::::::::::::::::::::::::::::

function getCoordinate(column,row) {

    lines = split(coordinates, "\n");
    values = split(lines[row+1], "\t"); /// +1 because the first line is the Title of columns

    if(column== "BX"){return values[1];}//BX
    if(column== "BY"){return values[2];}//BY

}

```

## 14 Références

- Abdallah BM, Figeac F, Larsen KH, Ditzel N, Keshari P, Isa A, Jafari A, Andersen TL, Delaisse J-M, Goshima Y, Ohshima T, Kassem M. 2016. **CRMP4 Inhibits Bone Formation by Negatively Regulating BMP and RhoA Signaling.** *Journal of Bone and Mineral Research* 1–31.
- Aggleton JP, Christiansen K. 2015. *The Subiculum: The Heart of the Extended Hippocampal System.* Elsevier B.V. 65-82 p.
- Aguezoul M, Andrieux A, Denarier E. 2003. **Overlap of promoter and coding sequences in the mouse STOP gene (Mtap6).** *Genomics* 81:623–627.
- Akbarian S, Sucher NJ, Bradley D, Tafazzoli A, Trinh D, Hetrick WP, Potkin SG, Sandman CA, Bunney WE, Jones EG. 1996. **Selective alterations in gene expression for NMDA receptor subunits in prefrontal cortex of schizophrenics.** *The Journal of neuroscience : the official journal of the Society for Neuroscience* 16:19–30.
- Alabed YZ, Pool M, Ong Tone S, Fournier AE. 2007. **Identification of CRMP4 as a convergent regulator of axon outgrowth inhibition.** *The Journal of neuroscience : the official journal of the Society for Neuroscience* 27:1702–11.
- Alabed YZ, Pool M, Ong Tone S, Sutherland C, Fournier AE. 2010. **GSK3 beta regulates myelin-dependent axon outgrowth inhibition through CRMP4.** *The Journal of neuroscience* 30:5635–5643.
- Alther TA, Domanitskaya E, Stoeckli ET. 2016. **Calsyntenin1-mediated trafficking of axon guidance receptors regulates the switch in axonal responsiveness at a choice point.** *Development* 1:994–1004.
- Amano M, Ito M, Fukata Y, Chihara K, Nakano T, Matsuura Y, Kaibuchi K. 1996. **Phosphorylation and activation of Myosin by Rho-associated.** *The Journal of biological chemistry* 271:20246–20249.
- Andrieux A, Salin P a, Vernet M, Kujala P, Baratier J, Gory-Fauré S, Bosc C, Pointu H, Proietto D, Schweitzer A, Denarier E, Klumperman J, et al. 2002. **The suppression of brain cold-stable microtubules in mice induces synaptic defects associated with neuroleptic-sensitive behavioral disorders.** *Genes & development* 16:2350–2364.
- Andrieux A, Salin P, Schweitzer A, Bégou M, Pachoud B, Brun P, Gory-Fauré S, Kujala P, Suaud-Chagny MF, Höfle G, Job D. 2006. **Microtubule Stabilizer Ameliorates Synaptic Function and Behavior in a Mouse Model for Schizophrenia.** *Biological Psychiatry* 60:1224–1230.
- Andrzejewski ME, Spencer RC, Kelley AE. 2006. **Dissociating Ventral and Dorsal Subicular Dopamine D1 Receptor Involvement in Instrumental Learning, Spontaneous Motor Behavior, and Motivation.** *Behavioural Neurosciences* 257:2432–2437.
- Arama J, Boulay AC, Bosc C, Delphin C, Loew D, Rostaing P, Amigou E, Ezan P, Wingertsmann L, Guillaud L, Andrieux A, Giaume C, et al. 2012. **Bmcc1s, a novel brain-isoform of Bmcc1, affects cell morphology by regulating MAP6/STOP functions.** *PLoS ONE* 7.:
- Arganda-Carreras I, Fernández-González R, Muñoz-Barrutia A, Ortiz-De-Solorzano C. 2010. **3D reconstruction of histological sections: Application to mammary gland tissue.** *Microscopy*



research and technique 73:1019–29.

Arimura N, Hattori A, Kimura T, Nakamuta S, Funahashi Y, Hirotsune S, Furuta K, Urano T, Toyoshima YY, Kaibuchi K. 2009a. **CRMP-2 directly binds to cytoplasmic dynein and interferes with its activity.** *Journal of Neurochemistry* 111:380–390.

Arimura N, Inagaki N, Chihara K, Ménager C, Nakamura N, Amano M, Iwamatsu A, Goshima Y, Kaibuchi K. 2000. **Phosphorylation of collapsin response mediator protein-2 by Rho-kinase: Evidence for two separate signaling pathways for growth cone collapse.** *Journal of Biological Chemistry* 275:23973–23980.

Arimura N, Kimura T, Nakamuta S, Taya S, Funahashi Y, Hattori A, Shimada A, Ménager C, Kawabata S, Fujii K, Iwamatsu A, Segal RA, et al. 2009b. **Anterograde Transport of TrkB in Axons Is Mediated by Direct Interaction with Slp1 and Rab27.** *Developmental Cell* 16:675–686.

Arimura N, Menager C, Kawano Y, Yoshimura T, Kawabata S, Hattori A, Fukata Y, Amano M, Goshima Y, Inagaki M, Morone N, Usukura J, et al. 2005. **Phosphorylation by Rho Kinase Regulates CRMP-2 Activity in Growth Cones.** *Molecular and Cellular Biology* 25:9973–9984.

Arnaud L, Ballif BA, Förster E, Cooper JA. 2003. **Fyn tyrosine kinase is a critical regulator of Disabled-1 during brain development.** *Current Biology* 13:9–17.

Ashwell KW, Waite PM, Marotte L. 1996. **Ontogeny of the projection tracts and commissural fibres in the forebrain of the tammar wallaby (*Macropus eugenii*): timing in comparison with other mammals.** *Brain, behavior and evolution* 47:8–22.

Aurandt J, Vikis HG, Gutkind JS, Ahn N, Guan K-L. 2002. **The semaphorin receptor plexin-B1 signals through a direct interaction with the Rho-specific nucleotide exchange factor, LARG.** *Proceedings of the National Academy of Sciences* 99:12085–12090.

Aylsworth A, Jiang SX, Desbois A, Hou ST. 2009. **Characterization of the role of full-length CRMP3 and its calpain-cleaved product in inhibiting microtubule polymerization and neurite outgrowth.** *Experimental Cell Research* 315:2856–2868.

Baas PW, Pienkowski TP, Cimbalnik K a, Toyama K, Bakalis S, Ahmad FJ, Kosik KS. 1994. **Tau confers drug stability but not cold stability to microtubules in living cells.** *Journal of cell science* 107 ( Pt 1):135–43.

Bader V, Tomppo L, Trossbach S V., Bradshaw NJ, Prikulis I, Rutger Leliveld S, Lin CY, Ishizuka K, Sawa A, Ramos A, Rosa I, García Á, et al. 2012. **Proteomic, genomic and translational approaches identify CRMP1 for a role in schizophrenia and its underlying traits.** *Human Molecular Genetics* 21:4406–4418.

Baratier J. 2006. **Phosphorylation of Microtubule-associated Protein STOP by Calmodulin Kinase II.** *Journal of Biological Chemistry* 281:19561–19569.

Baratier J, Peris L, Brocard J, Gory-Fauré S, Dufour F, Bosc C, Fourest-Lieuvain A, Blanchoin L, Salin P, Job D, Andrieux A. 2006. **Phosphorylation of microtubule-associated protein STOP by calmodulin kinase II.** *Journal of Biological Chemistry* 281:19561–19569.

Battistini C, Tamagnone L. 2016. **Transmembrane semaphorins, forward and reverse signaling: Have a look both ways.** *Cellular and Molecular Life Sciences* 73:1609–1622.

Battum EY Van, Brignani S, Pasterkamp RJ. 2015. **Axon guidance proteins in neurological**

**disorders.** *The Lancet Neurology* 14:532–546.

Baumann A, Kursula P. 2017. **SUMO on CRMPs - wrestling for pain?** *Channels* 0:1–3.

Bayer K-U, Koninck P De, Leonard AS, Hell JW, Schulman H. 2001. **Interaction with the NMDA receptor locks CaMKII in an active conformation.** *Nature* 411:801–805.

Beasley CL, Pennington K, Behan A, Wait R, Dunn MJ, Cotter D. 2006. **Proteomic analysis of the anterior cingulate cortex in the major psychiatric disorders: Evidence for disease-associated changes.** *Proteomics* 6:3414–3425.

Begou M, BRUN P, JEAN-BAPTISTE BERTRAND DJ, ANNIE SCHWEITZER, THIERRY D'AMATO MS, ANDRIEUX A, SUAUD-CHAGNY M-F. 2007. **Post-Pubertal Emergence of Alterations in Locomotor Activity in STOP Null Mice.** *Synapse (New York, NY)* 61:790–794.

Bégou M, Volle J, Bertrand JB, Brun P, Job, Schweitzer A, Saoud M, D'Amato T, Andrieux A, Suaud-Chagny MF. 2008. **The stop null mouse model for schizophrenia displays cognitive and social deficits partly alleviated by neuroleptics.** *Neuroscience* 158:1742.

Bellon A, Luchino J, Haigh K, Rougon G, Haigh J, Chauvet S, Mann F. 2010. **VEGFR2 (KDR/Fik1) signaling mediates axon growth in response to semaphorin 3E in the developing brain.** *Neuron* 66:205–219.

Benardais K, Kasem B, Couegnas A, Samama B, Fernandez S, Schaeffer C, Antal MC, Job D, Schweitzer A, Andrieux A, Giersch A, Nehlig A, et al. 2010. **Loss of STOP protein impairs peripheral olfactory neurogenesis.** *PLoS ONE* 5:1–14.

Benes FM, Sorensen I, Vincent SL, Bird ED, Sathi M. 1992. **Increased density of glutamate-immunoreactive vertical processes in superficial laminae in cingulate cortex of schizophrenic brain.** *Cerebral Cortex* 2:505–512.

Bielle F, Marcos-Mondéjar P, Leyva-Díaz E, Lokmane L, Mire E, Mailhes C, Keita M, García N, Tessier-Lavigne M, Garel S, López-Bendito G. 2011. **Emergent growth cone responses to combinations of Slit1 and Netrin 1 in thalamocortical axon topography.** *Current Biology* 21:1748–1755.

Binet S, Cohen E, Meininger V. 1987. **Heterogeneity of cold-stable and cold-labile tubulin in axon- and soma-enriched portions of the adult mouse brain.** *Neuroscience Letters* 77:166–170.

Bixby JL, Lilien J, Reichardt LF. 1988. **Identification of the major proteins that promote neuronal process outgrowth on Schwann cells in vitro.** *Journal of Cell Biology* 107:353–361.

Blockus H, Chédotal A. 2016. **Slit-Robo signaling.** *Development* 143:3037–3044.

Bosc C, Andrieux A, Job D. 2003. **Current Topics STOP Proteins †.** 42.:

Bosc C, Cronk JD, Pirolet F, Watterson DM, Haiechii J, Job D, Margolis RL. 1996. **Cloning , expression , and properties of the microtubule-stabilizing protein STOP.** 93:2125–2130.

Bosc C, Frank R, Denarier E, Ronjat M, Schweitzer A, Wehland J, Job D. 2001. **Identification of Novel Bifunctional Calmodulin-binding and Microtubule-stabilizing Motifs in STOP Proteins.** *Journal of Biological Chemistry* 276:30904–30913.

Bouvrais-Veret C, Weiss S, Andrieux A, Schweitzer A, McIntosh JM, Job D, Giros B, Martres MP. 2007. **Sustained increase of alpha7 nicotinic receptors and choline-induced improvement of learning deficit in STOP knock-out mice.** *Neuropharmacology* 52:1691–1700.

Bouvrais-Veret C, Weiss S, Hanoun N, Andrieux A, Schweitzer A, Job D, Hamon M, Giros B, Martres MP. 2008. **Microtubule-associated STOP protein deletion triggers restricted changes in dopaminergic neurotransmission.** *Journal of Neurochemistry* 104:745–756.

Brady ST, Tytell M, Lasek RJ. 1984. **Axonal tubulin and axonal microtubules: Biochemical evidence for cold stability.** *Journal of Cell Biology* 99:1716–1724.

Braff DL, Geyer MA. 1990. **Sensorimotor gating and schizophrenia. Human and animal model studies.** *Archives of general psychiatry* 47:181–8.

Brenner E, Sonnewald U, Schweitzer A, Andrieux A, Nehlig A. 2007. **Hypoglutamatergic Activity in the STOP Knockout Mouse: a Potential Model for Chronic Untreated Schizophrenia.** *Journal of neuroscience research* 85:2352–2359.

Bretin S, Rogemond V, Marin P, Maus M, Torrens Y, Honnorat J, Glowinski J, Prémont J, Gauchy C. 2006. **Calpain product of WT-CRMP2 reduces the amount of surface NR2B NMDA receptor subunit.** *Journal of Neurochemistry* 98:1252–1265.

Brinkley BR, Cartwright J. 1975. **Cold-Labile and Cold-Stable Microtubules in the Mitotic Spindle of Mammalian Cells.** *Annals of the New York Academy of Sciences* 253:428–439.

Brittain JM, Piekarczyk AD, Wang Y, Kondo T, Cummins TR, Khanna R. 2009. **An atypical role for collapsin response mediator protein 2 (CRMP-2) in neurotransmitter release via interaction with presynaptic voltage-gated calcium channels.** *Journal of Biological Chemistry* 284:31375–31390.

Brittain JM, Wang Y, Eruvwetere O, Khanna R. 2012. **Cdk5-mediated phosphorylation of CRMP-2 enhances its interaction with CaV2.2.** *FEBS Letters* 586:3813–3818.

Brot S, Rogemond V, Perrot V, Chounlamountri N, Auger C, Honnorat J, Moradi-Ameli M. 2010. **CRMP5 Interacts with Tubulin to Inhibit Neurite Outgrowth, Thereby Modulating the Function of CRMP2.** *Journal of Neuroscience* 30:10639–10654.

Brot S, Smaoune H, Youssef-Issa M, Malleval C, Benetollo C, Besançon R, Auger C, Moradi-Ameli M, Honnorat J. 2014. **Collapsin response-mediator protein 5 (CRMP5) phosphorylation at threonine 516 regulates neurite outgrowth inhibition.** *European Journal of Neuroscience* 40:3010–3020.

Brown M. 2004. **Alpha2-Chimaerin, Cyclin-Dependent Kinase 5/p35, and Its Target Collapsin Response Mediator Protein-2 Are Essential Components in Semaphorin 3A-Induced Growth-Cone Collapse.** *Journal of Neuroscience* 24:8994–9004.

Brun P, Bégou M, Andrieux A, Mouly-Badina L, Clerget M, Schweitzer A, Scarna H, Renaud B, Job D, Suaud-Chagny MF. 2005. **Dopaminergic transmission in STOP null mice.** *Journal of Neurochemistry* 94:63–73.

Buck KB, Zheng JQ. 2002. **Growth Cone Turning Induced by Direct Local Modification of Microtubule Dynamics.** *The Journal of Neuroscience* 22:9358–9367.

Buel GR, Rush J, Ballif BA. 2010. **Fyn promotes phosphorylation of collapsin response mediator protein 1 at tyrosine 504, a novel, isoform-specific regulatory site.** *Journal of Cellular Biochemistry* 111:20–28.

Burk K, Mire E, Bellon A, Hocine M, Guillot J, Moraes F, Yoshida Y, Simons M, Chauvet S, Mann F. 2017. **Post-endocytic sorting of Plexin-D1 controls signal transduction and development of**

**axonal and vascular circuits.** Nature Communications 8:14508.

Byk T, Ozon S, Sobel A. 1998. **The Ulip family phosphoproteins--common and specific properties.** European journal of biochemistry / FEBS 254:14–24.

Cai G, Wu D, Wang Z, Xu Z, Wong K-B, Ng C-F, Chan FL, Yu S. 2016. **Collapsin response mediator protein-1 (CRMP1) acts as an invasion and metastasis suppressor of prostate cancer via its suppression of epithelial–mesenchymal transition and remodeling of actin cytoskeleton organization.** Oncogene 1:1–13.

Cai Z, Chattopadhyay N, Liu WJ, Chan C, Pignol J-P, Reilly RM. 2011. **Optimized digital counting colonies of clonogenic assays using ImageJ software and customized macros: Comparison with manual counting.** International Journal of Radiation Biology 87:1135–1146.

Camdessanché J-P, Ferraud K, Boutahar N, Lassablière F, Mutter M, Touret M, Kolattukudy P, Honnorat J, Antoine J-C. 2012. **The Collapsin Response Mediator Protein 5 Onconeural Protein Is Expressed in Schwann Cells Under Axonal Signals and Regulates Axon—Schwann Cell Interactions.** Journal of Neuropathology & Experimental Neurology 71:298–311.

Castellani V, Chédotal A, Schachner M, Faivre-Sarrailh C, Rougon G. 2000. **Analysis of the L1-Deficient Mouse Phenotype Reveals Cross-Talk between Sema3A and L1 Signaling Pathways in Axonal Guidance.** Neuron 27:237–249.

Cha C, Zhang J, Ji Z, Tan M, Li S, Wu F, Chen K, Gong S, Guo G, Lin H. 2016. **CRMP4 regulates dendritic growth and maturation via the interaction with actin cytoskeleton in cultured hippocampal neurons.** Brain Research Bulletin 124:286–294.

Chae YC, Lee S, Heo K, Ha SH, Jung Y, Kim JH, Ihara Y, Suh PG, Ryu SH. 2009. **Collapsin response mediator protein-2 regulates neurite formation by modulating tubulin GTPase activity.** Cellular Signalling 21:1818–1826.

Chai S-C, White NM. 2004. **Effects of Fimbria-Fornix, Hippocampus, and Amygdala Lesions on Discrimination Between Proximal Locations.** Behavioral Neuroscience 118:770–784.

Charrier E, Aguera M, Thomasset N, Honnorat J. 2003. **Collapsin Response Mediator Proteins ( CRMPs ).** Molecular Neurobiology 28:51–63.

Charrier E, Mosinger B, Meissirel C, Aguera M, Belin M, Goshima Y, Honnorat J, Thomasset N. 2006. **Transient alterations in granule cell proliferation , apoptosis and migration in postnatal developing cerebellum of.** 1337–1352.

Chauvet S, Cohen S, Yoshida Y, Fekrane L, Livet J, Gayet O, Segu L, Buhot MC, Jessell TM, Henderson CE, Mann F. 2007. **Gating of Sema3E/PlexinD1 Signaling by Neuropilin-1 Switches Axonal Repulsion to Attraction during Brain Development.** Neuron 56:807–822.

Chi XX, Schmutzler BS, Brittain JM, Wang Y, Hingtgen CM, Nicol GD, Khanna R. 2009. **Regulation of N-type voltage-gated calcium channels (Cav2.2) and transmitter release by collapsin response mediator protein-2 (CRMP-2) in sensory neurons.** Journal of Cell Science 122:4351–4362.

Cole AR, Causeret F, Yadirgi G, Hastie CJ, McLauchlan H, McManus EJ, Hernández F, Eickholt BJ, Nikolic M, Sutherland C. 2006. **Distinct priming kinases contribute to differential regulation of collapsin response mediator proteins by glycogen synthase kinase-3 in vivo.** The Journal of biological chemistry 281:16591–8.

Cole RN, Hart GW. 2001. **Cytosolic O-glycosylation is abundant in nerve terminals**. *Journal of Neurochemistry* 79:1080–1089.

Comer FI, Hart GW. 2000. **O-glycosylation of nuclear and cytosolic proteins. Dynamic interplay between O-GlcNAc and O-phosphate**. *Journal of Biological Chemistry* 275:29179–29182.

Cosker KE, Eickholt BJ. 2007. **Phosphoinositide 3-kinase signalling events controlling axonal morphogenesis**. *Biochemical Society transactions* 35:207–10.

Couegnas A, Schweitzer A, Andrieux A, Ghandour MS, Boehm N. 2007. **Expression Pattern of STOP lacZ Reporter Gene in Adult and Developing Mouse Brain Alice**. *Journal of neuroscience research* 85:1515–1527.

Cowan CA, Henkemeyer M. 2002. **Ephrins in reverse, park and drive**. *Trends in Cell Biology* 12:339–346.

Daoust A, Bohic S, Saoudi Y, Debacker C, Gory-Fauré S, Andrieux A, Barbier EL, Deloulme JC. 2014. **Neuronal transport defects of the MAP6 KO mouse - a model of schizophrenia - and alleviation by Epothilone D treatment, as observed using MEMRI**. *NeuroImage* 96:133–142file:///C:/Users/Benoit%20Boulan/Downloads/.

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

Deloulme J-C, Gory-Fauré S, Mauconduit F, Chauvet S, Jonckheere J, Boulan B, Mire E, Xue J, Jany M, Maucler C, Deparis A a, Montigon O, et al. 2015. **Microtubule-associated protein 6 mediates neuronal connectivity through Semaphorin 3E-dependent signalling for axonal growth**. *Nature communications* 6:7246.

Delphin C, Bouvier D, Seggio M, Couriol E, Saoudi Y, Denarier E, Bosc C, Valiron O, Bisbal M, Arnal I, Andrieux A. 2012. **MAP6-F is a temperature sensor that directly binds to and protects microtubules from cold-induced depolymerization**. *Journal of Biological Chemistry* 287:35127–35138.

Denarier E, Aguezoul M, Jolly C, Vourc'h C, Roure A, Andrieux A, Bosc C, Job D. 1998a. **Genomic structure and chromosomal mapping of the mouse STOP gene (Mtap6)**. *Biochemical and biophysical research communications* 243:791–6.

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

Deo RC, Schmidt EF, Elhabazi A, Togashi H, Burley SK, Stephen M. 2004. **Structural bases for CRMP function in plexin- dependent semaphorin3A signaling**. *The EMBO Journal* 9–22.

Ding JB, Oh W-J, Sabatini BL, Gu C. 2012. **Semaphorin 3E-Plexin-D1 signaling controls pathway-specific synapse formation in the striatum**. *Nature neuroscience* 15:215–23.

Drazba J, Lemmon V. 1990. **The role of cell adhesion molecules in neurite outgrowth on Muller cells**. *Dev Biol* 138:82–93.

Dustrude E, Moutal A, Yang X, Wang Y, Khanna M, Khanna R. 2016. **Hierarchical CRMP2 posttranslational modifications control Nav1.7 function**. *Proceedings of the National Academy of*

Sciences 113:E8443–E8452.

Dustrude ET, Perez-Miller S, François-Moutal L, Moutal A, Khanna M, Khanna R. 2017. **A single structurally conserved SUMOylation site in CRMP2 controls NaV1.7 function.** Channels (Austin, Tex) 1–13.

Eastwood SL, Lyon L, George L, Andrieux A, Job D, Harrison PJ. 2007. **Altered expression of synaptic protein mRNAs in STOP (MAP6) mutant mice.** Journal of psychopharmacology (Oxford, England) 21:635–44.

Edgar PF, Douglas JE, Cooper GJ, Dean B, Kydd R, Faull RL. 2000. **Comparative proteome analysis of the hippocampus implicates chromosome 6q in schizophrenia.** Molecular psychiatry 5:85–90.

Ehrman LA, Mu X, Waclaw RR, Yoshida Y, Vorhees C V, Klein WH. 2013. **The LIM homeobox gene Isl1 is required for the correct development of the striatonigral pathway in the mouse.**

Elie A, Prezel E, Guérin C, Denarier E, Ramirez-Rios S, Serre L, Andrieux A, Fourest-Lieuvain A, Blanchoin L, Arnal I. 2015. **Tau Co-Organizes Dynamic Microtubule and Actin Networks.** Scientific Reports 5:9964.

Engmann O, Hortobágyi T, Pidsley R, Troakes C, Bernstein HG, Kreutz MR, Mill J, Nikolic M, Giese KP. 2011. **Schizophrenia is associated with dysregulation of a Cdk5 activator that regulates synaptic protein expression and cognition.** Brain 134:2408–2421.

Erick C, Peris L, Andrieux A, Meissirel C, Gruber AD, Vernet M, Schweitzer A, Saoudi Y, Pointu H, Bosc C, Salin P a, Job D, et al. 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.

Fazeli A, Dickinson SLL, Hermiston ML, Tighe R V, Steen RG, Small CGG, Stoeckli ETT, Keino-Masu K, Masu M, Rayburn H, Simons J, Bronson RT, et al. 1997. Nature.

Feldheim DA, O'Leary DDM. 2010. **Visual Map Development : Bidirectional Signaling, Bifunctional Guidance Molecules, and Competition.** Cold Spring Harbor Laboratory Press 1–20.

Fernández-Gamba A, Leal MC, Maarouf CL, Richter-Landsberg C, Wu T, Morelli L, Roher AE, Castaño EM. 2012. **Collapsin response mediator protein-2 phosphorylation promotes the reversible retraction of oligodendrocyte processes in response to non-lethal oxidative stress.** Journal of Neurochemistry 121:985–995.

Fletcher BR. 2006. **Fornix Lesions Decouple the Induction of Hippocampal Arc Transcription from Behavior But Not Plasticity.** Journal of Neuroscience 26:1507–1515.

Föcking M, Dicker P, English J a, Schubert KO, Dunn MJ, Cotter DR. 2011. **Common proteomic changes in the hippocampus in schizophrenia and bipolar disorder and particular evidence for involvement of cornu ammonis regions 2 and 3.** Archives of general psychiatry 68:477–488.

Fournet V, Jany M, Fabre V, Chali F, Orsal D, Schweitzer A, Andrieux A, Messanvi F, Giros B, Hamon M, Lanfumey L, Deloulme JC, et al. 2010. **The deletion of the microtubule-associated STOP protein affects the serotonergic mouse brain network.** Journal of Neurochemistry 115:1579–1594.

Fournet V, Lavilléon G De, Schweitzer A, Giros B, Andrieux A, Martres MP. 2012a. **Both chronic treatments by epothilone D and fluoxetine increase the short-term memory and differentially**



**alter the mood status of STOP/MAP6 KO mice.** *Journal of Neurochemistry* 123:982–996.

Fournet V, Schweitzer A, Chevarin C, Deloulme JC, Hamon M, Giros B, Andrieux A, Martres MP. 2012b. **The deletion of STOP/MAP6 protein in mice triggers highly altered mood and impaired cognitive performances.** *Journal of Neurochemistry* 121:99–114.

Fradley RL, O'Meara GF, Newman RJ, Andrieux A, Job D, Reynolds DS. 2005. **STOP knockout and NMDA NR1 hypomorphic mice exhibit deficits in sensorimotor gating.** *Behavioural Brain Research* 163:257–264.

Fujita Y, Yamashita T. 2014. **Axon growth inhibition by RhoA/ROCK in the central nervous system.** *Frontiers in Neuroscience* 8:1–12.

Fukada M, Watakabe I, Yuasa-Kawada J, Kawachi H, Kuroiwa A, Matsuda Y, Noda M. 2000. **Molecular characterization of CRMP5, a novel member of the collapsin response mediator protein family.** *Journal of Biological Chemistry* 275:37957–37965.

Fukata Y, Itoh TJ, Kimura T, Ménager C, Nishimura T, Shiromizu T, Watanabe H, Inagaki N, Iwamatsu A, Hotani H, Kaibuchi K. 2002. **CRMP-2 binds to tubulin heterodimers to promote microtubule assembly.** *Nature Cell Biology*.

Fukunaga K, Muller D, Miyamoto E. 1996. **CaM kinase II in long-term potentiation.** *Neurochem Int* 28:343–358.

Fukushima Y, Okada M, Kataoka H, Hirashima M, Yoshida Y, Mann F, Gomi F, Nishida K, Nishikawa SI, Uemura A. 2011. **Sema3E-PlexinD1 signaling selectively suppresses disoriented angiogenesis in ischemic retinopathy in mice.** *Journal of Clinical Investigation* 121:1974–1985.

Galiano MR, Bosc C, Schweitzer A, Andrieux A, Job D, Hallak ME. 2004. **Astrocytes and oligodendrocytes express different STOP protein isoforms.** *Journal of Neuroscience Research* 78:329–337.

Gao PP, Yue Y, Cerretti DP, Dreyfus C, Zhou R. 1999. **Ephrin-dependent growth and pruning of hippocampal axons.** *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 96:4073–7.

Garey L. 2010. **When cortical development goes wrong: Schizophrenia as a neurodevelopmental disease of microcircuits.** *Journal of Anatomy* 217:324–333.

Gimenez U, Boulan B, Mauconduit F, Taurel F, Denarier E, Brocard J, Gory-fauré S, Andrieux A, Lahrech H, Deloulme JC. 2017. **3D imaging of the brain morphology and connectivity defects in a model of psychiatric disorders: MAP6-KO mice.** *Scientific Reports*.

Goghari VM, Billiet T, Sunaert S, Emsell L. 2014. **A diffusion tensor imaging family study of the fornix in schizophrenia.** *Schizophrenia Research* 159:435–440.

Gong X, Tan M, Gao Y, Chen K, Guo G. 2016. **CRMP - 5 interacts with actin to regulate neurite outgrowth.** *MOLECULAR MEDICINE REPORTS* 1179–1185.

Gory-Fauré S, Windscheid V, Bosc C, Peris L, Proietto D, Franck R, Denarier E, Job D, Andrieux A. 2006. **STOP-like protein 21 is a novel member of the STOP family, revealing a Golgi localization of STOP proteins.** *The Journal of biological chemistry* 281:28387–28396.

Gory-Fauré S, Windscheid V, Brocard J, Montessuit S, Tsutsumi R, Denarier E, Fukata Y, Bosc C, Delaroche J, Collomb N, Fukata M, Martinou J-C, et al. 2014. **Non-Microtubular Localizations of**

**Microtubule-Associated Protein 6 (MAP6).** PloS one 9:e114905.

Goshima Y, Nakamura F, Strittmatter P, Strittmatter SM. 1995. **Collapsin-induced growth cone collapse mediator by an intracellular protein related to UNC-33.** Nature 509–514.

Govek E, Newey SE, Aelst L Van. 2005. **The role of the Rho GTPases in neuronal development** **The role of the Rho GTPases in neuronal development.** Genes and Development 19:1–49.

Gozes I. 2011. **Microtubules, schizophrenia and cognitive behavior: Preclinical development of davunetide (NAP) as a peptide-drug candidate.** Peptides 32:428–431.

Gu C. 2005. **Semaphorin 3E and Plexin-D1 Control Vascular Pattern Independently of Neuropilins.** Science 307:265–268.

Guidotti A, Auta J, Davis JM, Di-Giorgi-Gerevini V, Dwivedi Y, Grayson DR, Impagnatiello F, Pandey G, Pesold C, Sharma R, Uzunov D, Costa E, et al. 2000. **Decrease in reelin and glutamic acid decarboxylase67 (GAD67) expression in schizophrenia and bipolar disorder: a postmortem brain study.** Archives of general psychiatry 57:1061–9.

Guillaud L, Bosc C, Fourest-Lieuvin A, Denarier E, Pirolet F, Lafanechère L, Job D. 1998. **STOP proteins are responsible for the high degree of microtubule stabilization observed in neuronal cells.** Journal of Cell Biology 142:167–179.

Hamajima N, Matsuda K, Sakata S, Tamaki N, Sasaki M, Nonaka M. 1996. **A novel gene family defined by human dihydropyrimidinase and three related proteins with differential tissue distribution.** Gene 180:157–163.

Hanaya R, Koning E, Ferrandon A, Schweitzer A, Andrieux A, Nehlig A. 2008. **Deletion of the STOP gene, a microtubule stabilizing factor, leads only to discrete cerebral metabolic changes in mice.** Journal of Neuroscience Research 86:813–820.

Hansen JE, Lund O, Tolstrup N, Gooley AA, Williams KL, Brunak S. 1998. **NetOglyc: prediction of mucin type O-glycosylation sites based on sequence context and surface accessibility.** Glycoconjugate journal 15:115–30.

Harrelson a L, Goodman CS. 1988. **Growth cone guidance in insects: fasciclin II is a member of the immunoglobulin superfamily.** Science 242:700–708.

Harrison PJ. 2004. **The hippocampus in schizophrenia: a review of the neuropathological evidence and its pathophysiological implications.** Psychopharmacology 174:151–162.

Hattori D, Demir E, Kim HW, Viragh E, Zipursky SL, Dickson BJ. 2007. **Dscam diversity is essential for neuronal wiring and self-recognition.** Nature 449:223–7.

Hattori M, Osterfield M, Flanagan JG. 2000. **Regulated cleavage of a contact-mediated axon repellent.** Science (New York, NY) 289:1360–5.

He Z, Tessier-Lavigne M. 1997. **Neuropilin is a receptor for the axonal chemorepellent semaphorin III.** Cell 90:739–751.

Heasman SJ, Ridley AJ. 2008. **Mammalian Rho GTPases: new insights into their functions from in vivo studies.** Nature reviews Molecular cell biology 9:690–701.

Hedgecock EM, Culotti JG, Hall DH. 1990. **The unc-5, unc-6, and unc-40 genes guide circumferential migrations of pioneer axons and mesodermal cells on the epidermis in C. elegans.** Neuron 4:61–85.

Hedgecock EM, Culotti JG, Thomson JN, Perkins LA. 1985. **Axonal guidance mutants of *Caenorhabditis elegans* identified by filling sensory neurons with fluorescein dyes.** *Developmental Biology* 111:158–170.

Herman JP, Cullinan WE, Morano MI, Akil H, Watson SJ. 1995. **Contribution of the Ventral Subiculum to Inhibitory Regulation of the Hypothalamo-Pituitary-Adrenocortical Axis.** *Journal of Neuroendocrinology* 7:475–482.

Herman JP, Mueller NK. 2006. **Role of the ventral subiculum in stress integration.** *Behavioural Brain Research* 174:215–224.

Hermida MA, Dinesh Kumar J, Leslie NR. 2017. **GSK3 and its interactions with the PI3K/AKT/mTOR signalling network.** *Advances in Biological Regulation* 1–11.

Holm L, Sander C. 1997. **An evolutionary treasure: Unification of a broad set of amidohydrolases related to urease.** *Proteins: Structure, Function and Genetics* 28:72–82.

Hong K, Hinck L, Nishiyama M, Poo MM, Tessier-Lavigne M, Stein E. 1999. **A ligand-gated association between cytoplasmic domains of UNC5 and DCC family receptors converts netrin-induced growth cone attraction to repulsion.** *Cell* 97:927–941.

Hou ST. 2006. **Calpain-Cleaved Collapsin Response Mediator Protein-3 Induces Neuronal Death after Glutamate Toxicity and Cerebral Ischemia.** *Journal of Neuroscience* 26:2241–2249.

Hou ST, Jiang SX, Aylsworth A, Cooke M, Zhou L. 2013. **Collapsin response mediator protein 3 deacetylates histone H4 to mediate nuclear condensation and neuronal death.** *Scientific reports* 3:1350.

Hou ST, Jiang SX, Aylsworth A, Ferguson G, Slinn J, Hu H, Leung T, Kappler J, Kaibuchi K. 2009. **CaMKII phosphorylates collapsin response mediator protein 2 and modulates axonal damage during glutamate excitotoxicity.** *Journal of Neurochemistry* 111:870–881.

Huber AB, Kolodkin AL, Ginty DD, Cloutier J-F. 2003. **SIGNALING AT THE GROWTH CONE: Ligand-Receptor Complexes and the Control of Axon Growth and Guidance.** *Annu Rev Neurosci* 26:509–63.

Inoue A, Sanes JR. 1997. **Lamina-specific connectivity in the brain: regulation by N-cadherin, neurotrophins, and glycoconjugates.** *Science* 276:1428–1431.

Ishii N, Wadsworth WG, Stern BD, Culotti JG, Hedgecock EM. 1992. **UNC-6, a laminin-related protein, guides cell and pioneer axon migrations in *C. elegans*.** *Neuron* 9:873–81.

Islam SM, Shinmyo Y, Okafuji T, Su Y, Naser I Bin, Ahmed G, Zhang S, Chen S, Ohta K, Kiyonari H, Abe T, Tanaka S, et al. 2009. **Draxin, a repulsive guidance protein for spinal cord and forebrain commissures.** *Science (New York, NY)* 323:388–393.

Ito Y, Oinuma I, Katoh H, Kaibuchi K, Negishi M. 2006. **Sema4D/plexin-B1 activates GSK-3 $\beta$  through R-Ras GAP activity, inducing growth cone collapse.** *EMBO reports* 7:704–709.

Jang SY, Shin YK, Jung J, Lee SH, Seo SY, Suh DJ, Park HT. 2010. **Injury-induced CRMP4 expression in adult sensory neurons; a possible target gene for ciliary neurotrophic factor.** *Neuroscience Letters* 485:37–42.

Ji Z, Tan M, Gao Y, Zhang J, Gong X, Guo G, Lin H. 2014. **CRMP-5 interacts with tubulin to promote growth cone development in neurons.** *International Journal of Clinical and Experimental*

Medicine 7:67–75.

Jiang SX, Kappler J, Zurakowski B, Desbois A, Aylsworth A, Hou ST. 2007. **Calpain cleavage of collapsin response mediator proteins in ischemic mouse brain.** The European journal of neuroscience 26:801–9.

Job D, Fischer EH, Margolis RL. 1981. **Rapid disassembly of cold-stable microtubules by calmodulin.** Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America 78:4679–82.

Job D, Rauch CT, Fischer EH, Margolis RL, Job D. 1982. **Recycling of Cold-Stable Microtubules: Evidence That Cold Stability Is Due to Substoichiometric Polymer Blocks.** Biochemistry 21:509–515.

Joly S, Jordi N, Schwab ME, Pernet V. 2014. **The Ephrin receptor EphA4 restricts axonal sprouting and enhances branching in the injured mouse optic nerve.** European Journal of Neuroscience 40:3021–3031.

Ju W, Li Q, Wilson SM, Brittain JM, Meroueh L, Khanna R. 2013. **SUMOylation alters CRMP2 regulation of calcium influx in sensory neurons.** Channels 7:153–159.

Julien F, Bechara A, Fiore R, Nawabi H, Zhou H, Hoyo-Becerra C, Bozon M, Rougon G, Grumet M, Püschel AW, Sanes JR, Castellani V. 2005. **Dual functional activity of semaphorin 3B is required for positioning the anterior commissure.** Neuron 48:63–75.

Kantor DB, Chivatakarn O, Peer KL, Oster SF, Inatani M, Hansen MJ, Flanagan JG, Yamaguchi Y, Sretavan DW, Giger RJ, Kolodkin AL. 2004. **Semaphorin 5A is a bifunctional axon guidance cue regulated by heparan and chondroitin sulfate proteoglycans.** Neuron 44:961–975.

Kaplan A, Kent CB, Charron F, Fournier AE. 2014. **Switching responses: Spatial and temporal regulators of axon guidance.** Molecular Neurobiology 49:1077–1086.

Kato Y, Hamajima N, Inagaki H, Okamura N, Koji T, Sasaki M, Nonaka M. 1998. **Post-meiotic expression of the mouse dihydropyrimidinase-related protein 3 (DRP-3) gene during spermiogenesis.** Molecular Reproduction and Development 51:105–111.

Kawano Y, Yoshimura T, Tsuboi D, Kaneko-kawano T, Shirataki H, Kawabata S. 2005. **CRMP-2 Is Involved in Kinesin-1-Dependent Transport of the Sra-1 / WAVE1 Complex and Axon Formation.** MOLECULAR AND CELLULAR BIOLOGY 25:9920–9935.

Kedracka-Krok S, Swiderska B, Jankowska U, Skupien-Rabian B, Solich J, Buczak K, Dziedzicka-Wasylewska M. 2014. **Clozapine influences cytoskeleton structure and calcium homeostasis in rat cerebral cortex and has a different proteomic profile than risperidone.** Journal of neurochemistry.

Keleman K, Dickson BJ. 2001. **Short- and long-range repulsion by the Drosophila Unc5 Netrin receptor.** Neuron 32:605–617.

Kennedy TE, Serafini T, la Torre JR de, Tessier-Lavigne M. 1994. **Netrins are diffusible chemotropic factors for commissural axons in the embryonic spinal cord.** Cell 78:425–435.

Khazaei MR, Girouard M-P, Alchini R, Ong Tone S, Shimada T, Bechstedt S, Cowan M, Guillet D, Wiseman PW, Brouhard G, Cloutier JF, Fournier AE. 2014. **Collapsin Response Mediator Protein 4 Regulates Growth Cone Dynamics through the Actin and Microtubule Cytoskeleton.** The Journal

of biological chemistry 289:30133–43.

Kidd T, Bland KS, Goodman CS. 1999. **Slit Is the Midline Repellent for the Robo Receptor in Drosophila.** Cell 96:785–794.

Kidd T, Brose K, Mitchell KJ, Fetter RD, Tessier-Lavigne M, Goodman CS, Tear G. 1998. **Roundabout controls axon crossing of the CNS midline and defines a novel subfamily of evolutionarily conserved guidance receptors.** Cell 92:205–215.

Kim J, Oh WJ, Gaiano N, Yoshida Y, Gu C. 2011. **Semaphorin 3E-plexin-d1 signaling regulates VEGF function in developmental angiogenesis via a feedback mechanism.** Genes and Development 25:1399–1411.

Kim MD, Kolodziej P, Chiba A. 2002. **Growth cone pathfinding and filopodial dynamics are mediated separately by Cdc42 activation.** The Journal of neuroscience 22:1794–1806.

Kimura K, Ito M, Amano M, Chihara K, Fukata Y, Nakafuku M, Yamamori B, Feng J, Nakano T, Okawa K, Iwamatsu A, Kaibuchi K. 1996. **Regulation of Myosin Phosphatase by Rho and Rho-Associated Kinase (Rho-Kinase).** Science 273:245–248.

Kimura T, Watanabe H, Iwamatsu A, Kaibuchi K. 2005. **Tubulin and CRMP-2 complex is transported via Kinesin-1.** Journal of neurochemistry 93:1371–82.

Kitamura K, Takayama M, Hamajima N, Nakanishi M, Sasaki M, Endo Y, Takemoto T, Kimura H, Iwaki M, Nonaka M. 1999. **Characterization of the human dihydropyrimidinase-related protein 2 (DRP-2) gene.** DNA research : an international journal for rapid publication of reports on genes and genomes 6:291–7.

Koch M, Murrell JR, Hunter DD, Olson PF, Jin W, Keene DR, Brunken WJ, Burgeson RE. 2000. **A novel member of the netrin family, beta-netrin, shares homology with the beta chain of laminin: identification, expression, and functional characterization.** The Journal of cell biology 151:221–234.

Kolodkin AL, Levengood D V., Rowe EG, Tai YT, Giger RJ, Ginty DD. 1997. **Neuropilin is a semaphorin III receptor.** Cell 90:753–762.

Kowara R, Chen Q, Milliken M, Chakravarthy B. 2005. **Calpain-mediated truncation of dihydropyrimidinase-like 3 protein (DPYSL3) in response to NMDA and H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> toxicity.** Journal of neurochemistry 95:466–74.

Landini G. 2008. Advanced shape analysis with ImageJ.

Lee S-H, Kubicki M, Asami T, Seidman LJ, Goldstein JM, Mesholam-Gately RI, McCarley RW, Shenton ME. 2013. **Extensive white matter abnormalities in patients with first-episode schizophrenia: A diffusion tensor imaging (DTI) study.** Schizophrenia Research 143:231–238.

Leung T, Ng Y, Cheong A, Ng CH, Tan I, Hall C, Lim L. 2002. **p80 ROK $\alpha$  binding protein is a novel splice variant of CRMP-1 which associates with CRMP-2 and modulates RhoA-induced neuronal morphology.** FEBS Letters 532:445–449.

Lewis SA, Wang DH, Cowan NJ. 1988. **Microtubule-associated protein MAP2 shares a microtubule binding motif with tau protein.** Science (New York, NY) 242:936–9.

Li K, Pang J, Cheng H, Liu W-P, Di J-M, Xiao H-J, Luo Y, Zhang H, Huang W-T, Chen M-K, Li L-Y, Shao C-K, et al. 2015. **Manipulation of prostate cancer metastasis by locus-specific modification**

**of the CRMP4 promoter region using chimeric TALE DNA methyltransferase and demethylase.** *Oncotarget* 6:10030–44.

Lieuvain A, Labbé JC, Dorée M, Job D. 1994. **Intrinsic microtubule stability in interphase cells.** *Journal of Cell Biology* 124:985–996.

Lin P-CC, Chan PM, Hall C, Manser E. 2011. **Collapsin response mediator proteins (CRMPs) are a new class of microtubule-associated protein (MAP) that selectively interacts with assembled microtubules via a taxol-sensitive binding interaction.** *Journal of Biological Chemistry* 286:41466–41478.

Liu G, Dwyer T. 2014. **Microtubule dynamics in axon guidance.** *Neuroscience Bulletin* 30:569–583.

Liu PC, Yang ZJ, Qiu MH, Zhang LM, Sun FY. 2003. **Induction of CRMP-4 in striatum of adult rat after transient brain ischemia.** *Acta Pharmacologica Sinica* 24:1205–1211.

Liu W, Zhou X-W, Liu S, Hu K, Wang C, He Q, Li M. 2009. **Calpain-truncated CRMP-3 and -4 contribute to potassium deprivation-induced apoptosis of cerebellar granule neurons.** *Proteomics* 9:3712–28.

Liu Z, Martin LJ. 2003. **Olfactory bulb core is a rich source of neural progenitor and stem cells in adult rodent and human.** *Journal of Comparative Neurology* 459:368–391.

Liz MA, Mar FM, Santos TE, Pimentel HI, Marques AM, Morgado MM, Vieira S, Sousa VF, Pemble H, Wittmann T, Sutherland C, Woodgett JR, et al. 2014. **Neuronal deletion of GSK3 $\beta$  increases microtubule speed in the growth cone and enhances axon regeneration via CRMP-2 and independently of MAP1B and CLASP2.** *BMC Biology* 12:47.

Lowery LA, Vactor D Van. 2009. **The trip of the tip: understanding the growth cone machinery.** *Nature reviews Molecular cell biology* 10:332–43.

Lowry CA. 2002. **Functional subsets of serotonergic neurones: Implications for control of the hypothalamic-pituitary-adrenal axis.** *Journal of Neuroendocrinology* 14:911–923.

Ma L, Tessier-Lavigne M. 2007. **Dual branch-promoting and branch-repelling actions of Slit/Robo signaling on peripheral and central branches of developing sensory axons.** *The Journal of neuroscience : the official journal of the Society for Neuroscience* 27:6843–6851.

Machida T, Fujita T, Ooo ML, Ohira M, Isogai E, Mihara M, Hirato J, Tomotsune D, Hirata T, Fujimori M, Adachi W, Nakagawara A. 2006. **Increased expression of proapoptotic BMCC1, a novel gene with the BNIP2 and Cdc42GAP homology (BCH) domain, is associated with favorable prognosis in human neuroblastomas.** *Oncogene* 25:1931–1942.

Majava V, Löytynoja N, Chen WQ, Lubec G, Kursula P. 2008. **Crystal and solution structure, stability and post-translational modifications of collapsin response mediator protein 2.** *FEBS Journal* 275:4583–4596.

Margolis RL, Rauch CT, Job D. 1986. **Purification and assay of a 145-kDa protein (STOP145) with microtubule-stabilizing and motility behavior.** *Proceedings of the National Academy of Sciences* 83:639–643.

Marler KJM, Becker-Barroso E, Martínez A, Llovera M, Wentzel C, Poopalasundaram S, Hindges R, Soriano E, Comella J, Drescher U. 2008. **A TrkB/EphrinA interaction controls retinal axon branching and synaptogenesis.** *The Journal of neuroscience : the official journal of the Society for*



Neuroscience 28:12700–12.

Marsh L, Letourneau PC. 1984. **Growth of neurites without filopodial or lamellipodial activity in the presence of cytochalasin B.** Journal of Cell Biology 99:2041–2047.

Meadows SM, Fletcher PJ, Moran C, Xu K, Neufeld G, Chauvet S, Mann F, Krieg PA, Cleaver O. 2012. **Integration of repulsive guidance cues generates avascular zones that shape mammalian blood vessels.** Circulation Research 110:34–36.

Merenlender-Wagner A, Pikman R, Giladi E, Andrieux A, Gozes I. 2010. **NAP (davunetide) enhances cognitive behavior in the STOP heterozygous mouse-A microtubule-deficient model of schizophrenia.** Peptides 31:1368–1373.

Merenlender-Wagner A, Shemer Z, Touloumi O, Lagoudaki R, Giladi E, Andrieux A, Grigoriadis NC, Gozes I. 2014. **New horizons in schizophrenia treatment: Autophagy protection is coupled with behavioral improvements in a mouse model of schizophrenia.** Autophagy 10:2324–2332.

Miller SG, Kennedy MB. 1986. **Regulation of brain Type II Ca<sup>2+</sup>-calmodulin-dependent protein kinase by autophosphorylation: A Ca<sup>2+</sup>-triggered molecular switch.** Cell 44:861–870.

Mimura F, Yamagishi S, Arimura N, Fujitani M, Kubo T, Kaibuchi K, Yamashita T. 2006. **Myelin-associated glycoprotein inhibits microtubule assembly by a Rho-kinase-dependent mechanism.** Journal of Biological Chemistry 281:15970–15979.

Minturn JE, Fryer HJ, Geschwind DH, Hockfield S. 1995a. **TOAD-64, a gene expressed early in neuronal differentiation in the rat, is related to unc-33, a C. elegans gene involved in axon outgrowth.** The Journal of neuroscience : the official journal of the Society for Neuroscience 15:6757–66.

Minturn JE, Geschwind DH, Fryer HJL, Hockfield S. 1995b. **Early postmitotic neurons transiently express TOAD64, a neural specific protein.** Journal of Comparative Neurology 355:369–379.

Mitsui N, Inatome R, Takahashi S, Goshima Y, Yamamura H, Yanagi S. 2002. **Involvement of Fes / Fps tyrosine kinase in semaphorin3A signaling.** EMBO Journal 21.:

Molyneaux BJ, Arlotta P, Fame RM, MacDonald JL, MacQuarrie KL, Macklis JD. 2009. **Novel Subtype-Specific Genes Identify Distinct Subpopulations of Callosal Projection Neurons.** Journal of Neuroscience 29:12343–12354.

Moore SW, Correia JP, Lai Wing Sun K, Pool M, Fournier AE, Kennedy TE. 2008. **Rho inhibition recruits DCC to the neuronal plasma membrane and enhances axon chemoattraction to netrin 1.** Development 135:2855–2864.

Morales D, Kania A. 2016. **Cooperation and crosstalk in axon guidance cue integration: Additivity, synergy, and fine-tuning in combinatorial signaling.** Developmental Neurobiology.

Morderer D, Nikolaienko O, Skrypkina I, Cherkas V, Tsyba L, Belan P, Rynditch A. 2012. **Endocytic adaptor protein intersectin 1 forms a complex with microtubule stabilizer STOP in neurons.** Gene 505:360–364.

Morgan-Fisher M, Couchman JR, Yoneda A. 2013. **Phosphorylation and mRNA Splicing of Collapsin Response Mediator Protein-2 Determine Inhibition of Rho-associated Protein Kinase (ROCK) II Function in Carcinoma Cell Migration and Invasion.** Journal of Biological Chemistry 288:31229–31240.

Morimura R, Nozawa K, Tanaka H, Ohshima T. 2013. **Phosphorylation of Dpsyl2 (CRMP2) and Dpsyl3 (CRMP4) is required for positioning of caudal primary motor neurons in the zebrafish spinal cord.** *Developmental neurobiology* 73:911–20.

Morris RGM, Schenk F, Tweedie F, Jarrard LE. 1990. **Ibotenate Lesions of Hippocampus and/or Subiculum: Dissociating Components of Allocentric Spatial Learning.** *European Journal of Neuroscience* 2:1016–1028.

Mueller NK, Dolgas CM, Herman JP. 2004. **Stressor-selective role of the ventral subiculum in regulation of neuroendocrine stress responses.** *Endocrinology* 145:3763–3768.

Myllykoski M, Baumann A, Hensley K, Kursula P. 2017. **Collapsin response mediator protein 2: high-resolution crystal structure sheds light on small-molecule binding, post-translational modifications, and conformational flexibility.** *Amino Acids* 49:747–759.

Nacher J, Rosell DR, McEwen BS. 2000. **Widespread expression of rat collapsin response-mediated protein 4 in the telencephalon and other areas of the adult rat central nervous system.** *Journal of Comparative Neurology* 424:628–639.

Nagai J, Kitamura Y, Owada K, Yamashita N, Takei K, Goshima Y, Ohshima T. 2015. **Crmp4 deletion promotes recovery from spinal cord injury by neuroprotection and limited scar formation.** *Scientific reports* 5:8269.

Nagai J, Owada K, Kitamura Y, Goshima Y, Ohshima T. 2016a. **Inhibition of CRMP2 phosphorylation repairs CNS by regulating neurotrophic and inhibitory responses.** *Experimental Neurology* 277:283–295.

Nagai J, Takaya R, Piao W, Goshima Y, Ohshima T. 2016b. **Deletion of Crmp4 attenuates CSPG-induced inhibition of axonal growth and induces nociceptive recovery after spinal cord injury.** *Molecular and Cellular Neuroscience* 74:42–48.

Nawabi H, Briançon-Marjollet A, Clark C, Sanyas I, Takamatsu H, Okuno T, Kumanogoh A, Bozon M, Takeshima K, Yoshida Y, Moret F, Abouzid K, et al. 2010. **A midline switch of receptor processing regulates commissural axon guidance in vertebrates.** *Genes and Development* 24:396–410.

Nern A, Zhu Y, Zipursky SL. 2008. **Local N-Cadherin Interactions Mediate Distinct Steps in the Targeting of Lamina Neurons.** *Neuron* 58:34–41.

Nettles JH, Li H, Cornett B, Krahn JM, Snyder JP, Downing KH. 2004. **The Binding Mode of Epothilone A on  $\alpha,\beta$ -Tubulin by Electron Crystallography.** *Science* 305:866–869.

Ng J, Nardine T, Harms M, Tzu J, Goldstein A, Sun Y, Dietzl G, Dickson BJ, Luo L. 2002. **Rac GTPases control axon growth, guidance and branching.** *Nature* 416:442–447.

Niisato E, Nagai J, Yamashita N, Abe T, Kiyonari H, Goshima Y, Ohshima T. 2011. **CRMP4 suppresses apical dendrite bifurcation of CA1 pyramidal neurons in the mouse hippocampus.** *Developmental Neurobiology* 72:1447–1457.

Niisato E, Nagai J, Yamashita N, Nakamura F, Goshima Y, Ohshima T. 2012. **Phosphorylation of CRMP2 is involved in proper bifurcation of the apical dendrite of hippocampal CA1 pyramidal neurons.** *Developmental Neurobiology* 73:142–151.

Nishimura T, Fukata Y, Kato K, Yamaguchi T, Matsuura Y, Kamiguchi H, Kaibuchi K. 2003. **CRMP-2 regulates polarized Numb-mediated endocytosis for axon growth.** *Nature Cell Biology* 5:819–826.

- Nishiyama M, Schimmelmann MJ, Togashi K, Findley WM, Hong K. 2008. **Membrane potential shifts caused by diffusible guidance signals direct growth-cone turning.** *Nature Neuroscience* 11:762–771.
- O'Mara SM, Sanchez-Vives M V., Brotons-Mas JR, O'Hare E. 2009. **Roles for the subiculum in spatial information processing, memory, motivation and the temporal control of behaviour.** *Progress in Neuro-Psychopharmacology and Biological Psychiatry* 33:782–790.
- Oliva AA, James CD, Kingman CE, Craighead HG, Banker GA. 2003. **Patterning Axonal Guidance Molecules Using a Novel Strategy for Microcontact Printing.** *Neurochemical Research* 28:1639–1648.
- Ong KH, De J, Cheng L, Ahmed S, Yu W. 2016. **NeuronCyto II: An automatic and quantitative solution for crossover neural cells in high throughput screening.** *Cytometry Part A* 89:747–754.
- Palmer A, Zimmer M, Erdmann KS, Eulenburg V, Porthin A, Heumann R, Deutsch U, Klein R. 2002. **EphrinB phosphorylation and reverse signaling: Regulation by Src kinases and PTP-BL phosphatase.** *Molecular Cell* 9:725–737.
- Petratos S, Lee JY. 2013. **Stop CRMPing my style: A new competitive model of CRMP oligomerization.** *Journal of Neurochemistry* 125:800–802.
- Ponnusamy R, Lohkamp B. 2013. **Insights into the oligomerization of CRMPs: Crystal structure of human collapsin response mediator protein 5.** *Journal of Neurochemistry* 125:855–868.
- Powell KJ, Hori SE, Leslie R, Andrieux A, Schellinck H, Thorne M, Robertson GS. 2007. **Cognitive impairments in the STOP null mouse model of schizophrenia.** *Behav Neurosci* 121:826–835.
- Qu C, Dwyer T, Shao Q, Yang T, Huang H, Liu G. 2013. **Direct binding of TUBB3 with DCC couples netrin-1 signaling to intracellular microtubule dynamics in axon outgrowth and guidance.** *Journal of cell science* 126:3070–81.
- Quach TT, Glasper ER, Devries a C, Honnorat J, Kolattukudy PE, Duchemin a M. 2008a. **Altered prepulse inhibition in mice with dendrite abnormalities of hippocampal neurons.** *Molecular psychiatry* 13:656–8.
- Quach TT, Honnorat J, Kolattukudy PE, Khanna R, Duchemin a M. 2015. **CRMPs: critical molecules for neurite morphogenesis and neuropsychiatric diseases.** *Molecular Psychiatry* 275:27291–27302.
- Quach TT, Massicotte G, Belin M-F, Honnorat J, Glasper ER, Devries AC, Jakeman LB, Baudry M, Duchemin A-M, Kolattukudy PE. 2008b. **CRMP3 is required for hippocampal CA1 dendritic organization and plasticity.** *The FASEB Journal* 22:401–409.
- Quach TT, Wang Y, Khanna R, Chounlamountri N, Auvergnon N, Honnorat J, Duchemin A-M. 2011. **Effect of CRMP3 expression on dystrophic dendrites of hippocampal neurons.** *Molecular Psychiatry* 16:689–691.
- Quach TT, Wilson SM, Rogemond V, Chounlamountri N, Kolattukudy PE, Martinez S, Khanna M, Belin M-F, Khanna R, Honnorat J, Duchemin A-M. 2013. **Mapping CRMP3 domains involved in dendrite morphogenesis and voltage-gated calcium channel regulation.** *Journal of Cell Science* 126:4262–4273.
- Quinn CC, Chen E, Kinjo TG, Kelly G, Bell AW, Elliott RC, McPherson PS, Hockfield S. 2003. **TUC-4b,**

**a novel TUC family variant, regulates neurite outgrowth and associates with vesicles in the growth cone.** *The Journal of neuroscience : the official journal of the Society for Neuroscience* 23:2815–23.

Quinn CC, Gray GE, Hockfield S. 1999. **A family of proteins implicated in axon guidance and outgrowth.** *Journal of Neurobiology* 41:158–164.

Rawlins JNP, Feldon J, Tonkiss J, Coffey PJ. 1989. **The role of subicular outputs in the development of the partial reinforcement extinction effect.** *Experimental Brain Research* 77:153–160.

Rembutsu M, Soutar M, Aalten L Van, Gourlay R, Hastie C, McLauchlan H, Morrice N, Cole A, Sutherland C. 2008. **Novel procedure to investigate the effect of phosphorylation on protein complex formation in vitro and in cells.** 2153–2161.

Remington G, Agid O, Foussias G. 2011. **Schizophrenia as a disorder of too little dopamine: implications for symptoms and treatment.** *Expert Review of Neurotherapeutics* 11:589–607.

Ricard D, Rogemond V, Charrier E, Aguera M, Bagnard D, Belin MF, Thomasset N, Honnorat J. 2001. **Isolation and expression pattern of human Unc-33-like phosphoprotein 6/collapsin response mediator protein 5 (Ulip6/CRMP5): coexistence with Ulip2/CRMP2 in Sema3a- sensitive oligodendrocytes.** *The Journal of neuroscience : the official journal of the Society for Neuroscience* 21:7203–14.

Ricard D, Stankoff B, Bagnard D, Aguera M, Rogemond V, Antoine JC, Spassky N, Zalc B, Lubetzki C, Belin MF, Honnorat J. 2000. **Differential expression of collapsin response mediator proteins (CRMP/ULIP) in subsets of oligodendrocytes in the postnatal rodent brain.** *Molecular and cellular neurosciences* 16:324–37.

Rice MW, Roberts RC, Melendez-Ferro M, Perez-Costas E. 2016. **Mapping dopaminergic deficiencies in the substantia nigra/ventral tegmental area in schizophrenia.** *Brain Structure and Function* 221:185–201.

Richard M, Sacquet J, Jany M, Schweitzer A, Jourdan F, Andrieux A, Pellier-Monnin V. 2009. **STOP proteins contribute to the maturation of the olfactory system.** *Molecular and Cellular Neuroscience* 41:120–134.

Richardson PM, McGuinness UM, Aguayo AJ. 1980. **Axons from CNS neurons regenerate into PNS grafts.** *Nature* 284:264–5.

Ridley AJ, Schwartz MA, Burridge K, Firtel RA, Ginsberg MH, Borisy G, Parsons JT, Horwitz AR. 2003. **Cell migration: integrating signals from front to back.** *Science (New York, NY)* 302:1704–9.

Robinson JA. 1969. **Vinblastine-Induced Precipitation of Microtubule Protein.**

Rogemond V, Auger C, Giraudon P, Becchi M, Auvergnon N, Belin MF, Honnorat J, Moradi-Améli M. 2008. **Processing and nuclear localization of CRMP2 during brain development induce neurite outgrowth inhibition.** *Journal of Biological Chemistry* 283:14751–14761.

Ross CA, Margolis RL, Reading SAJJ, Pletnikov M, Coyle JT. 2000. **Neurobiology of Schizophrenia.** *Annals of Neurology* 48:556 – 566.

Rosslénbroich V, Dai L, Baader SL, Noegel A a, Gieselmann V, Kappler J. 2005. **Collapsin response mediator protein-4 regulates F-actin bundling.** *Experimental cell research* 310:434–44.

Rünker AE, O'Tuathaigh C, Dunleavy M, Morris DW, Little GE, Corvin AP, Gill M, Henshall DC, Waddington JL, Mitchell KJ. 2011. **Mutation of Semaphorin-6A disrupts limbic and cortical connectivity and models neurodevelopmental psychopathology.** PLoS ONE 6.:

Sabatier C, Plump AS, Ma L, Brose K, Tamada A, Murakami F, Lee EYHP, Tessier-Lavigne M. 2004. **The divergent robo family protein Rig-1/Robo3 is a negative regulator of slit responsiveness required for midline crossing by commissural axons.** Cell 117:157–169.

Sahin M, Greer PL, Lin MZ, Poucher H, Eberhart J, Schmidt S, Wright TM, Shamah SM, O'Connell S, Cowan CW, Hu L, Goldberg JL, et al. 2005. **Eph-dependent tyrosine phosphorylation of ephexin1 modulates growth cone collapse.** Neuron 46:191–204.

Sanders L. 2009. **Trawling the brain: New findings raise questions about reliability of fMRI as gauge of neural activity.** Science News 176:16–20.

Sasaki Y, Cheng C, Uchida Y, Nakajima O, Ohshima T, Yagi T, Taniguchi M, Nakayama T, Kishida R, Kudo Y, Ohno S, Nakamura F, et al. 2002. **Fyn and Cdk5 mediate semaphorin-3A signaling, which is involved in regulation of dendrite orientation in cerebral cortex.** Neuron 35:907–920.

Schaefer AW, Kabir N, Forscher P. 2002. **Filopodia and actin arcs guide the assembly and transport of two populations of microtubules with unique dynamic parameters in neuronal growth cones.** Journal of Cell Biology 158:139–152.

Schaefer AW, Schoonderwoert VTG, Ji L, Mederios N, Danuser G, Forscher P. 2008. **Coordination of Actin Filament and Microtubule Dynamics during Neurite Outgrowth.** Developmental Cell 15:146–162.

Schliwa M, Euteneuer U, Bulinski JC, Izant JG. 1981. **Calcium lability of cytoplasmic microtubules and its modulation by microtubule-associated proteins.** Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America 78:1037–41.

Schneider JL, Miller AM, Woesner ME. 2017. **Autophagy and Schizophrenia: A Closer Look at How Dysregulation of Neuronal Cell Homeostasis Influences the Pathogenesis of Schizophrenia.** Einstein Journal of Biology and Medicine 31:34.

Schultz C, Engelhardt M. 2014. **Anatomy of the hippocampal formation.** The Hippocampus in Clinical Neuroscience 34:6–17.

Schwenk BM, Lang CM, Hognl S, Tahirovic S, Orozco D, Lichtenthaler SF, Hoogenraad CC, Capell A, Haass C. 2013. **The FTL risk factor TMEM 106 B and MAP 6 control dendritic trafficking of lysosomes.** 49:1–18.

Seki T. 2002. **Expression patterns of immature neuronal markers PSA-NCAM, CRMP-4 and NeuroD in the hippocampus of young adult and aged rodents.** Journal of Neuroscience Research 70:327–334.

Serafini T, Colamarino SA, Leonardo ED, Wang H, Beddington R, Skarnes WC, Tessier-Lavigne M. 1996. **Netrin-1 is required for commissural axon guidance in the developing vertebrate nervous system.** Cell 87:1001–1014.

Sharp PE. 1999. **Complimentary roles for hippocampal versus subicular/entorhinal place cells in coding place, context, and events.** Hippocampus 9:432–443.

Sharp PE, Green C. 1994. **Spatial correlates of firing patterns of single cells in the subiculum of**

**the freely moving rat.** *The Journal of neuroscience* : the official journal of the Society for Neuroscience 14:2339–2356.

Shen K, Cowan CW. 2010. **Guidance Molecules in Synapse Formation and Plasticity** Kang. Cold Spring Harbor Perspect Biol.

Shih JY, Yang SC, Hong TM, Yuan a, Chen JJ, Yu CJ, Chang YL, Lee YC, Peck K, Wu CW, Yang PC. 2001. **Collapsin response mediator protein-1 and the invasion and metastasis of cancer cells.** *Journal of the National Cancer Institute* 93:1392–400.

Shimizu H, Iwayama Y, Yamada K, Toyota T, Minabe Y, Nakamura K, Nakajima M, Hattori E, Mori N, Osumi N, Yoshikawa T. 2006. **Genetic and expression analyses of the STOP (MAP6) gene in schizophrenia.** *Schizophrenia Research* 84:244–252.

Shinmyo Y, Asrafuzzaman Riyadh M, Ahmed G, Naser I Bin, Hossain M, Takebayashi H, Kawasaki H, Ohta K, Tanaka H. 2015. **Draxin from neocortical neurons controls the guidance of thalamocortical projections into the neocortex.** *Nature Communications* 6:10232.

Silver L, Michael J V., Goldfinger LE, Gallo G. 2014. **Activation of PI3K and R-ras signaling promotes the extension of sensory axons on inhibitory chondroitin sulfate proteoglycans.** *Developmental Neurobiology* 74:918–933.

Song H, Ming G, He Z, Lehmann M, McKerracher L, Tessier-Lavigne M, Poo M. 1998. **Conversion of Neuronal Growth Cone Responses from Repulsion to Attraction by Cyclic Nucleotides.** *Science* 281:1515–1518.

Song H, Ming G, Poo M. 1997. **cAMP-induced switching in turning direction of nerve growth cones.** *Nature* 388:275–279.

Stein E, Tessier-Lavigne M. 2001. **Hierarchical Organization of Guidance Receptors: Silencing of Netrin Attraction by Slit Through a Robo/DCC Receptor Complex.** *Science* 291:1928–1938.

Stoeckli ET, Landmesser LT. 1995. **Axonin-1, Nr-CAM, and Ng-CAM play different roles in the in vivo guidance of chick commissural neurons.** *Neuron* 14:1165–1179.

Su K, Chien W, Fu W, Yu I, Huang H, Huang P, Lin S, Shih J, Lin Y, Hsueh Y, Yang P, Lin S. 2007. **Mice Deficient in Collapsin Response Mediator Protein-1 Exhibit Impaired Long-Term Potentiation and Impaired Spatial Learning and Memory.** 27:2513–2524.

Suzuki Y, Nakagomi S, Namikawa K, Kiryu-seo S, Inagaki N, Kaibuchi K, Aizawa H, Kikuchi K, Kiyama H. 2003. **Collapsin response mediator protein-2 accelerates axon regeneration of nerve-injured motor neurons of rat.** 1042–1050.

Swiercz JM, Kuner R, Behrens J, Offermanns S. 2002. **Plexin-B1 directly interacts with PDZ-RhoGEF/LARG to regulate RhoA and growth cone morphology.** *Neuron* 35:51–63.

Takahashi T, Fournier A, Nakamura F, Wang LH, Murakami Y, Kalb RG, Fujisawa H, Strittmatter SM. 1999. **Plexin-neuropilin-1 complexes form functional semaphorin-3A receptors.** *Cell* 99:59–69.

Taketo MM, Araki Y, Matsunaga A, Yokoi A, Tsuchida J, Nishina Y, Nozaki M, Tanaka H, Koga M, Uchida K, Matsumiya K, Okuyama A, et al. 1997. **Mapping of eight testis-specific genes to mouse chromosomes.** *Genomics* 46:138–42.

Tamura Y, Kataoka Y, Cui Y, Takamori Y, Watanabe Y, Yamada H. 2007. **Multi-directional differentiation of doublecortin- and NG2-immunopositive progenitor cells in the adult rat**



**neocortex in vivo.** *European Journal of Neuroscience* 25:3489–3498.

Tan M, Cha C, Ye Y, Zhang J, Li S, Wu F, Gong S, Guo G. 2015. **CRMP4 and CRMP2 interact to coordinate cytoskeleton dynamics, regulating growth cone development and axon elongation.** *Neural Plasticity* 2015.:

Tanaka H, Morimura R, Ohshima T. 2012. **Dpysl2 (CRMP2) and Dpysl3 (CRMP4) phosphorylation by Cdk5 and DYRK2 is required for proper positioning of Rohon-Beard neurons and neural crest cells during neurulation in zebrafish.** *Developmental Biology* 370:223–236.

Tcherkezian J, Lamarche-vane N. 2007. **Current knowledge of the large RhoGAP family of proteins.** *Biology of the cell* 99:67–86.

Tessier-Lavigne M, Goodman CS. 1996. **The Molecular Biology of Axon Guidance.** *Science* 274:1123.

Tessier-Lavigne M, Placzek M, Lumsden AG, Dodd J, Jessell TM. 1988. **Chemotropic guidance of developing axons in the mammalian central nervous system.** *Nature* 336:775–778.

Thomas AG, Koumellis P, Dineen RA. 2011. **The Fornix in Health and Disease: An Imaging Review.** *RadioGraphics* 31:1107–1121.

Togashi K, Schimmelmann MJ von, Nishiyama M, Lim CS, Yoshida N, Yun B, Molday RS, Goshima Y, Hong K. 2008. **Cyclic GMP-Gated CNG Channels Function in Semaphorin 3A-Induced Growth Cone Repulsion.** *Neuron* 58:694–707.

Tonouchi A, Nagai J, Togashi K, Goshima Y, Ohshima T. 2016. **Loss of collapsin response mediator protein 4 suppresses dopaminergic neuron death in an 1-methyl-4-phenyl-1,2,3,6-tetrahydropyridine-induced mouse model of Parkinson's disease.** *Journal of Neurochemistry* 137:795–805.

Torres R, Polymeropoulos MH. 1998. **Genomic Organization and Localization of the Human CRMP-1 Gene.** *DNA RESEARCH* 18:473–477.

Tortosa E, Adolfs Y, Fukata M, Pasterkamp RJ, Kapitein LC, Hoogenraad CC. 2017. **Dynamic Palmitoylation Targets MAP6 to the Axon to Promote Microtubule Stabilization during Neuronal Polarization.** *Neuron* 94:809–825.e7.

Tran TS, Kolodkin AL, Bharadwaj R. 2007. **Semaphorin Regulation of Cellular Morphology.** *Annual Review of Cell and Developmental Biology* 23:263–292.

Tsuboi D, Hikita T, Qadota H, Amano M, Kaibuchi K. 2005. **Regulatory machinery of UNC-33 Ce-CRMP localization in neurites during neuronal development in Caenorhabditis elegans.** *Journal of Neurochemistry* 95:1629–1641.

Tsutiya A, Nishihara M, Goshima Y, Ohtani-Kaneko R. 2015. **Mouse pups lacking collapsin response mediator protein 4 (CRMP4) manifest impaired olfactory function and hyperactivity in the olfactory bulb.** *European Journal of Neuroscience* n/a–n/a.

Tsutiya A, Watanabe H, Nakano Y, Nishihara M, Goshima Y, Ohtani-Kaneko R. 2016. **Deletion of collapsin response mediator protein 4 results in abnormal layer thickness and elongation of mitral cell apical dendrites in the neonatal olfactory bulb.** *Journal of Anatomy* n/a–n/a.

Turney SG, Bridgman PC. 2005. **Laminin stimulates and guides axonal outgrowth via growth cone myosin II activity.** *Nature neuroscience* 8:717–719.

Uchida Y, Ohshima T, Sasaki Y, Suzuki H, Yanai S, Yamashita N, Nakamura F, Takei K, Ihara Y, Mikoshiba K, Kolattukudy P, Honnorat J, et al. 2005. **Semaphorin3A signalling is mediated via sequential Cdk5 and GSK3B phosphorylation of CRMP2: Implication of common phosphorylating mechanism underlying axon guidance and Alzheimer's disease.** *Genes to Cells* 10:165–179.

Uchida Y, Ohshima T, Yamashita N, Ogawara M, Sasaki Y, Nakamura F, Goshima Y. 2009. **Semaphorin3A signaling mediated by fyn-dependent tyrosine phosphorylation of collapsin response mediator protein 2 at tyrosine 32.** *Journal of Biological Chemistry* 284:27393–27401.

Uesugi K, Oinuma I, Katoh H, Negishi M. 2009. **Different requirement for Rnd GTPases of R-Ras GAP activity of Plexin-C1 and Plexin-D1.** *Journal of Biological Chemistry* 284:6743–6751.

Vann SD. 2010. **Re-evaluating the role of the mammillary bodies in memory.** *Neuropsychologia* 48:2316–2327.

Vann SD. 2013. **Dismantling the papez circuit for memory in rats.** *eLife* 2013:1–21.

Vann SD, Aggleton JP. 2003. **Evidence of a spatial encoding deficit in rats with lesions of the mammillary bodies or mammillothalamic tract.** *The Journal of neuroscience : the official journal of the Society for Neuroscience* 23:3506–3514.

Vann SD, Erichsen JT, O'Mara SM, Aggleton JP. 2011. **Selective disconnection of the hippocampal formation projections to the mammillary bodies produces only mild deficits on spatial memory tasks: Implications for fornix function.** *Hippocampus* 21:945–957.

Varrin-Doyer M, Vincent P, Cavagna S, Auvergnon N, Noraz N, Rogemond V, Honnorat J, Moradi-Améli M, Giraudon P. 2009. **Phosphorylation of collapsin response mediator protein 2 on Tyr-479 regulates CXCL12-induced T lymphocyte migration.** *Journal of Biological Chemistry* 284:13265–13276.

Volle J, Brocard J, Saoud M, Gory-Faure S, Brunelin J, Andrieux A, Suaud-Chagny MF. 2013. **Reduced expression of STOP/MAP6 in mice leads to cognitive deficits.** *Schizophrenia Bulletin* 39:969–978.

Vries M De, Cooper HM. 2008. **Emerging roles for neogenin and its ligands in CNS development.** *Journal of Neurochemistry* 106:1483–1492.

Wang H, Wang Z, Wang S, Li M, Nan L, Rhie JK, Covey JM, Zhang R, Hill DL. 2005. **Preclinical pharmacology of epothilone D, a novel tubulin-stabilizing antitumor agent.** *Cancer Chemotherapy and Pharmacology* 56:255–260.

Wang KH, Brose K, Arnott D, Kidd T, Goodman CS, Henzel W, Tessier-Lavigne M. 1999. **Biochemical purification of a mammalian slit protein as a positive regulator of sensory axon elongation and branching.** *Cell* 96:771–784.

Wang L, Strittmatter SM. 1997. **Brain CRMP Forms Heterotetramers Similar to Liver Dihydropyrimidinase.**

Wang LH, Strittmatter SM. 1996. **A family of rat CRMP genes is differentially expressed in the nervous system.** *The Journal of neuroscience : the official journal of the Society for Neuroscience* 16:6197–207.

Warner FJ. 1980. **The development of the forebrain in *Trichosurus vulpecula*.** *Okajimas folia*

anatomica Japonica 57:265–320.

Webb BC, Wilson L. 1980. **Cold-stable microtubules from brain**. Biochemistry 19:1993–2001.

Webster MJ, Shannon Weickert C, Herman MM, Hyde TM, Kleinman JE. 2001. **Synaptophysin and GAP-43 mRNA levels in the hippocampus of subjects with schizophrenia**. Schizophrenia research 49:89–98.

Weinstein JJ, Chohan MO, Slifstein M, Kegeles LS, Moore H, Abi-Dargham A. 2017. **Pathway-Specific Dopamine Abnormalities in Schizophrenia**. Biological Psychiatry 81:31–42.

Welniarz Q, Dusart I, Roze E. 2017. **The corticospinal tract: Evolution, development, and human disorders**. Developmental Neurobiology 77:810–829.

West RR, Tenbarge KM, Olmsted JB. 1991. **A model for microtubule-associated protein 4 structure: Domains defined by comparisons of human, mouse, and bovine sequences**. Journal of Biological Chemistry 266:21886–21896.

Whipple RA, Matrone MA, Cho EH, Balzer EM, Vitolo MI, Yoon JR, Ioffe OB, Tuttle KC, Yang J, Martin SS. 2010. **Epithelial-to-mesenchymal transition promotes tubulin detyrosination and microtentacles that enhance endothelial engagement**. Cancer Research 70:8127–8137.

Wilson SM, Brittain JM, Piekarz AD, Ballard CJ, Ripsch MS, Cummins TR, Hurley JH, Khanna M, Hammes NM, Samuels BC, White F a., Khanna R. 2011. **Further insights into the antinociceptive potential of a peptide disrupting the N-type calcium channel-CRMP-2 signaling complex**. Channels (Austin, Tex) 5:449–456.

Witter MP. 2006. **Connections of the subiculum of the rat: Topography in relation to columnar and laminar organization**. Behavioural Brain Research 174:251–264.

Wojtowicz WM, Wu W, Andre I, Qian B, Baker D, Zipursky SL. 2007. **A Vast Repertoire of Dscam Binding Specificities Arises from Modular Interactions of Variable Ig Domains**. Cell 130:1134–1145.

Wu H-Y, Lynch DR. 2006. **Calpain and synaptic function**. Molecular neurobiology 33:215–236.

Yam PT, Charron F. 2013. **Signaling mechanisms of non-conventional axon guidance cues: The Shh, BMP and Wnt morphogens**. Current Opinion in Neurobiology 23:965–973.

Yamashita N, Goshima Y. 2012. Molecular Neurobiology.

Yamashita N, Morita A, Uchida Y, Nakamura F, Usui H, Ohshima T, Taniguchi M, Honnorat J, Thomasset N, Takei K, Takahashi T, Kolattukudy P, et al. 2007. **Regulation of Spine Development by Semaphorin3A through Cyclin-Dependent Kinase 5 Phosphorylation of Collapsin Response Mediator Protein 1**. Journal of Neuroscience 27:12546–12554.

Yamashita N, Mosinger B, Roy A, Miyazaki M, Ugajin K, Nakamura F, Sasaki Y, Yamaguchi K, Kolattukudy P, Goshima Y. 2011. **CRMP5 (Collapsin Response Mediator Protein 5) Regulates Dendritic Development and Synaptic Plasticity in the Cerebellar Purkinje Cells**. Journal of Neuroscience 31:1773–1779.

Yamashita N, Ohshima T, Nakamura F, Kolattukudy P, Honnorat J, Mikoshiba K, Goshima Y. 2012. **Phosphorylation of CRMP2 (collapsin response mediator protein 2) is involved in proper dendritic field organization**. The Journal of neuroscience : the official journal of the Society for Neuroscience 32:1360–5.

Yamashita N, Takahashi A, Takao K, Yamamoto T, Kolattukudy P, Miyakawa T, Goshima Y. 2013. **Mice lacking collapsin response mediator protein 1 manifest hyperactivity, impaired learning and memory, and impaired prepulse inhibition.** *Frontiers in Behavioral Neuroscience* 7:1–10.

Yamashita N, Uchida Y, Ohshima T, Hirai S -i., Nakamura F, Taniguchi M, Mikoshiba K, Honnorat J, Kolattukudy P, Thomasset N, Takei K, Takahashi T, et al. 2006. **Collapsin Response Mediator Protein 1 Mediates Reelin Signaling in Cortical Neuronal Migration.** *Journal of Neuroscience* 26:13357–13362.

Yiu G, He Z. 2006. **Glial inhibition of CNS axon regeneration.** *Nature Reviews Neuroscience* 7:617–627.

Yoneda A, Morgan-Fisher M, Wait R, Couchman JR, Wewer UM. 2012. **A Collapsin Response Mediator Protein 2 Isoform Controls Myosin II-Mediated Cell Migration and Matrix Assembly by Trapping ROCK II.** *Molecular and Cellular Biology* 32:1788–1804.

Yoshimura T, Kawano Y, Arimura N, Kawabata S, Kikuchi A, Kaibuchi K. 2005. **GSK-3 $\beta$  Regulates Phosphorylation of CRMP-2 and Neuronal Polarity.** *Cell* 120:137–149.

Yuasa-Kawada J, Suzuki R, Kano F, Ohkawara T, Murata M, Noda M. 2003. **Axonal morphogenesis controlled by antagonistic roles of two CRMP subtypes in microtubule organization.** *European Journal of Neuroscience* 17:2329–2343.

Yukawa K, Tanaka T, Bai T, Ueyama T, Owada-akabe K, Tsubota Y, Maeda M, Suzuki K, Kikutani H, Kumanogoh A. 2005. **Semaphorin 4A induces growth cone collapse of hippocampal neurons in a Rho / Rho-kinase-dependent manner.** *INTERNATIONAL JOURNAL OF MOLECULAR MEDICINE* 115–118.

Yu-Kemp HC, Briehner WM. 2016. **Collapsin response mediator protein-1 regulates Arp2/3-dependent actin assembly.** *Journal of Biological Chemistry* 291:658–664.

Zelina P, Blockus H, Zagar Y, Péres A, Friocourt F, Wu Z, Rama N, Fouquet C, Hohenester E, Tessier-Lavigne M, Schweitzer J, Crollius HR, et al. 2014. **Signaling switch of the axon guidance receptor Robo3 during vertebrate evolution.** *Neuron* 84:1258–1272.

Zhang S, Su Y, Shinmyo Y, Islam SM, Naser I Bin, Ahmed G, Tamamaki N, Tanaka H. 2010. **Draxin, a repulsive axon guidance protein, is involved in hippocampal development.** *Neuroscience Research* 66:53–61.

Zheng JQ. 2000. **Turning of nerve growth cones induced by localized increases in intracellular calcium ions.** *Nature* 403:89–93.

Zhou W, Xie P, Pang M, Yang B, Fang Y, Shu T, Liu C, Wang X, Zhang L, Li S, Rong L. 2015. **Upregulation of CRMP4, a new prostate cancer metastasis suppressor gene, inhibits tumor growth in a nude mouse intratibial injection model.** *International Journal of Oncology* 46:290–298.



## Résumé

### **Etude de l'implication de CRMP4, un partenaire de MAP6, dans la voie de signalisation sémaphorine 3E.**

Pendant le développement embryonnaire, les neurones établissent des milliards de connexions. Ces connexions ne sont pas aléatoires, mais précisément orientées, dirigées par des molécules de guidage situées dans l'environnement cellulaire. Le branchement inapproprié de ces neurones a de graves conséquences sur les fonctions sensorielles, motrices et cognitives du système nerveux, aboutissant à des pathologies neurologiques et psychiatriques telle que la schizophrénie. Ainsi la mutation de certaines protéines impliquées dans le guidage de ces connexions, comme MAP6 ou CRMP4, peut entraîner des perturbations conduisant à des prédispositions pour le développement de telles pathologies. En effet l'absence de MAP6 (souris KO MAP6) conduit à l'altération de nombreuses connexions neuronales associée à différents troubles comportementaux réminiscent avec des symptômes schizoïdes. Parmi les faisceaux d'axones affectés on remarque la disparition du fornix, un faisceau neuronal connu pour son implication dans la schizophrénie. Cette disparition est en partie causée, en l'absence de MAP6, par l'abolition de la signalisation induite par la molécule de guidage sémaphorine 3E (Sema3E). Dans ce projet de thèse, le lien entre MAP6 et CRMP4 dans cette voie de signalisation Sema3E a pu être établi. De plus, l'impact de l'absence de la protéine CRMP4 sur la formation du fornix a pu être caractérisé par l'étude neuroanatomique des souris KO CRMP4. Nous avons par ailleurs pu mettre en évidence de nouvelles altérations causées par l'absence de MAP6. Dans son ensemble ce travail approfondit les connaissances des défauts des connectivités des souris KO MAP6 et identifie CRMP4 comme un nouvel acteur de la signalisation Sema3E et de la formation du fornix.

## Abstract

### **Study of the involvement of the MAP6 partners, CRMP4, in the semaphorin 3E signaling pathway.**

During embryonic development, neurons establish billion of connections between them. Those connections are not random. On the contrary, they are precisely targeted thanks to the driving by cellular environment guidance cues. A wrong branching of those neurons can lead to dramatic impairment of sensory, motor and cognitive function of the central nervous system resulting in neurologic or psychiatric disorders such as Schizophrenia. Thus, mutation of proteins implicated on neurons guidance like MAP6 or CRMP4 can lead to susceptibility for those kind of pathology occurrence. In fact, MAP6 deletion (MAP6 KO mice) leads to diverse neuronal connectivity alterations associated to schizophrenia-like behavior disorders. Among axonal tracts affected we notice the absence of the fornix known for its implication on Schizophrenia. In MAP6 KO mice, this fornix disruption is partly due to the loss of semaphorin 3E (Sema3E) dependant signaling pathway. This project shows the involvement of CRMP4, a partner of MAP6, in the Sema3E signaling pathway. Furthermore, it characterized the impact of the CRMP4 deletion (CRMP4 KO) on fornix formation. Finally, neuroanatomical studies allowed us to identify unknown alteration of MAP6 KO mice connectivity alteration.