

Modifications post-traductionnelles de la tubuline: identification des tubulines carboxypeptidases et découverte de nouveaux variants

Chrystelle Aillaud

► To cite this version:

Chrystelle Aillaud. Modifications post-traductionnelles de la tubuline : identification des tubulines carboxypeptidases et découverte de nouveaux variants. Biochimie, Biologie Moléculaire. Université Grenoble Alpes, 2017. Français. NNT : 2017GREAV049 . tel-02905440

HAL Id: tel-02905440 https://theses.hal.science/tel-02905440

Submitted on 23 Jul2020

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.

Communauté Ø UNIVERSITÉ Grenoble Alpes

CONFIDENTIEL

THÈSE

Pour obtenir le grade de

DOCTEUR DE LA COMMUNAUTE UNIVERSITE GRENOBLE ALPES

Spécialité : Neurosciences / Neurobiologie Arrêté ministériel : 25 mai 2016

Présentée par

Chrystelle AILLAUD

Thèse dirigée par Marie-Jo MOUTIN,

préparée au sein du Laboratoire « Physiopathologie du cytosquelette », INSERM U1216, Institut des Neurosciences de Grenoble (GIN) dans l'École Doctorale Chimie et Sciences du Vivant

Modifications post-traductionnelles de la tubuline : Identification des Tubuline CarboxyPeptidases et découverte de nouveaux variants.

Thèse soutenue publiquement le **20 octobre 2017** devant le jury composé de :

Mr Frédéric SAUDOU	
PU-PH, GIN, Grenoble	(Président)
Mme Anne DEBANT	
Directeur de Recherche, CRBM, Montpellier	(Rapporteur)
Mr Christian POÜS	
PU-PH, Université Paris- Sud	(Rapporteur)
Mr Michel STEINMETZ	
Professor, Institut Paul Scherrer, Suisse	(Membre)
Mme Marie-Jo MOUTIN	
Chargée de recherche, GIN, Grenoble	(Membre)



Remerciements aux Jurys et Collaborateurs :

Je tiens avant tout à remercier les membres du jury de ma thèse : les rapporteurs **Madame Anne Debant**, et **Monsieur Christian Poüs**, le président du jury **Monsieur Frédéric Saudou** mais également tout particulièrement **Monsieur Michel Steinmetz**, qui a accepté d'examiner mon travail en français. Merci à vous pour votre intérêt qui est un réel soutien et une vraie reconnaissance pour moi.

Un grand merci également à **Laura Sanman** de l'université de Stanford et à **Yohann Couté** de la plateforme EDyP pour leur accueil, leurs conseils techniques et leur investissement dans le projet, à **Laurence Lafanechère** pour son écoute et son énorme soutien qui allaient au-delà de mes comités de suivis de thèse. Merci à **Carsten Janke** pour ses précieux conseils et son intérêt tout au long de ma thèse. Et enfin, merci à **Krzystof Rogowski**, **Juliette Van Dijk**, **Annie et Marie-Jo** de m'avoir fait confiance dans ce projet.

Remerciements aux collègues, amis et famille :

Au premier semestre de ma licence 1 en biologie, du haut de mes 18 ans et avec absolument aucune envie d'aller au-delà du bac+3, j'ai participé à une UE de projet professionnel. J'avais choisi de me coller avec un groupe d'amies plutôt que de travailler sérieusement, et je me suis ainsi retrouvée dans le bureau d'Annie à l'écouter nous raconter comment elle en était arrivée à diriger son équipe et oh combien, avec le travail qu'elle fournissait, elle gagnerait au moins le double dans une entreprise privée. Je serais, cinq ans plus tard, la seule de ce groupe à choisir sans aucune hésitation de réaliser une thèse.

Je remercie ainsi profondément **Annie** pour son honnêteté et sa franchise qui m'auront permis de comprendre avant l'heure que la recherche était un métier de passion et quelques fois de sacrifices. Merci pour ton accueil chaleureux et ton partage, pour ta vision, ton écoute et surtout ta confiance au cours de ces cinq années. Par moments de très près et d'autres de loin, tu sais que ta présence et ta compréhension auront été fondamentales dans l'aboutissement de ce travail.

Un très grand merci évidemment à ma directrice de thèse **Marie-Jo Moutin** qui durant ces quatre années a tâché très consciencieusement à transmettre ses savoirs et ses conseils dans les disciplines de ma thèse. Au-delà de simples connaissances technico-pratiques, elle m'a permis de découvrir que les savoir-être, l'écoute et le partage tiennent une place capitale dans l'épanouissement d'un travail de thèse et d'un futur scientifique. Je la remercie pour son investissement. Son rôle de directrice lui tiens à cœur et sa protection dans un sujet aussi délicat que la purification d'une enzyme m'aura permis de publier un article en parallèle. Je dois également la remercier de m'avoir proposé à maintes fois de présenter nos travaux en congrès, et je suis consciente d'avoir été extrêmement chanceuse d'avoir pu participer à une petite dizaine de meeting en Europe et dans le monde. Enfin, en plus de son rôle de directrice, elle m'a également encouragé à m'investir dans la vie scientifique et sociale de l'institut et je lui en remercie car ce fut une expérience, quoique chronophage, très enrichissante.

Ce travail de thèse n'aurait évidemment pas pu aboutir sans les compétences et le partage illimité des connaissances et savoir-faire des membres de l'équipe. Merci **Cricri**, merci **Christian**, merci **Toff**, merci **Sylvie** et merci **Eric**. Merci pour votre conception du partage, merci pour votre

investissement professionnel et personnel à la réussite de vos étudiants mais également ceux des autres. Cet esprit réconfortant de partage, de soutien et de confiance qui est essentiel en recherche aura été très important à mes yeux. Au-delà de la science pure et dure, votre présence génère une sacré bonne ambiance - quoique parfois alambiquée, très poissonneuse ou un peu trop du vendredi pour un lundi – dans laquelle il est très agréable d'évoluer. Merci d'être jeune et singulier. Sachez aussi que malgré vos doutes récurrents, je ne pense pas une seconde que vous vous transformiez en vieux croutons (je viendrais néanmoins vérifier afin de minimiser tout relâchement !).

Mise à part un double merci (promis) pour son Ben « style », je dois un remerciement très spécial à mon collègue de bureau, monsieur **Benoit**. Si tu veux mon avis Ben, on n'est pas tombés dans cette équipe pour rien : les critères de sélection et d'intégration totale demandent un « petit » grain au cerveau, de l'humour au dessus du second degré et surtout un caractère un peu têtu. Je dois dire que par ton déconcertant second degré tu as été un sacré antistress quotidien! De manière un peu plus sérieuse, je te remercie pour ton écoute et tes conseils sur les différentes étapes un peu spéciales traversées pendant ma thèse durant lesquelles ton soutien et tes points de vue ont été très importants. Je n'oublie pas non plus que tu fus un vrai partenaire de soirées intergénérationnelles sans limites avec qui se faire jeter -avec délicatesse- de chez ses cheffes. Je dois le dire, la thèse mais surtout l'accoté de la thèse n'aurais jamais été similaire sans toi. Un immense merci Benito !

Je remercie également vous tous qui vous reconnaitrez, **collègue de l'équipe, de l'étage ou de l'institut** qui avez de près ou de loin participé à ce projet. Merci aussi à la génération passée de doctorants Marie-lise, Marc, Marine, Charlotte, Anouk, Mélina qui avait laissé une très belle ambiance de cohésion et de dynamisme au sein des doctorants. Merci aussi, aux doctorants et étudiants présents durant ma thèse qui ont amené de la vie dans l'institut parfois jusque très tard.

Evidemment, merci aux amis de fac et lycée (Law, Benj, Juju, Laurent, Eddy, Nanouu), de thèse (Benoit, Marine, Eléa, Marta, Lucie et Marc) ou de plongée (Raf, Delph, Ju, Jos, Trevors, Manon, Alexis et autres membres de notre chère promo saucisse) qui de près ou de loin ont participé à ma bonne santé mentale. Merci pour ces moments de décompression et désaturation :D !

Et pour finir, un très très grand merci à **ma maman** (que j'ai « tyronisé » à lire mon manuscrit sur les « mitrocubule»), à **ma sœur** et à **Joël** qui me soutiennent plus que quiconque et qui sont bien plus fières de moi que ce qui est autorisé à être. Merci à **Joris** de m'avoir supporté dans les moments les plus difficiles et intenses et de toujours m'avoir poussé de l'avant. Merci pour votre immense amour, confiance et soutien.

Liste des abréviations

ARN : Acide Ribonucléique ATP : Adénosine Triphosphate APC : *Adenomatous Polyposis Coli*

CAP-Gly : Cytoskeleton-Associated Protein Glycin-rich

CENP-E : Centrosome-associated protein E

CCP : Cytosolic CarboxyPeptidases

CLIP-170 : Cytoplasmic Linker of 170 kDa

CPA : CarboxyPeptidase A

EB : End binding Protein

GTP : Guanosine Triphosphate

HUVECs : Human umbilicac vein endothelial cells

LPA : Acide Lypophosphatidique

MAP : *Microtubules Associated Protein* MCAK : *Mitotic Centromere-Associated Kinesin* MT : Microtubule MPT : Modification post-traductionnelle

NTT : Non Tyrosinatable Tubulin

TCP : Tubuline CarboxyPeptidase + TIP : « plus » end Tracking Protein - TIP : « minus » end Tracking Protein TTL : Tubuline Tyrosine Ligase Tub : Tubuline Tub-déTyr : Tubuline détyrosinée Tub-Tyr : Tubuline Tyrosinée

SVBP : Small Vasohibin Binding Protein

Avant Propos

Au cours de l'évolution, lors du passage des organismes unicellulaires procaryotes à eucaryotes, on observe une complexification de la cellule. On distingue les cellules eucaryotes (du grec ancien *eu* « vrai » et *karyon* « noyau ») des cellules procaryotes (« sans noyau ») par la présence d'une membrane qui renferme l'information génétique constituant ainsi le noyau. D'autre part, alors que les cellules procaryotes sont relativement simples et petites, les cellules eucaryotes deviennent plus grandes, développent leur réseau membranaire, possèdent de plus en plus d'organelles et de compartiments cellulaires. En réponse à ces nouvelles contraintes physiques apparaissent alors les protéines constituant le squelette cellulaire ou cytosquelette. Ce cytosquelette est formé par un large réseau de polymères protéiques ayant pour rôle la définition de l'architecture cellulaire et le maintien de son intégrité. Il participe également à de nombreuses fonctions fondamentales telles que le transport intracellulaire, la motilité ou la contraction cellulaire.

Chez la majorité des Eucaryotes pluricellulaires, ce squelette cellulaire est composé de trois grands types de filaments aux propriétés mécaniques et dynamiques différentes (voir **Figure 1**) ;

100 nm 100 nm 25 nm	Filaments d'actine
1 100 nm 25 nm	Filaments intermédiaires
0 	Microtubules

Figure 1 : Les trois composantes du cytosquelette eucaryote.

- Les **filaments d'actine** dit microfilaments : ils ont un diamètre d'environ 7 nm, sont polarisés et extrêmement dynamiques. Ils jouent un rôle central dans la motilité, l'adhésion cellulaire, la cytokinèse (séparation des cellules filles après mitose), et la formation de l'axone des neurones, l'axogenèse.

- Les filaments intermédiaires : ils sont moins dynamiques et plus larges, de 10 à 12 nm de diamètre. Les filaments intermédiaires adoptent de nombreuses configurations selon le type cellulaire et la structure dans laquelle ils se trouvent. Ils ont des fonctions proprement mécaniques telles que le maintien des organites et du noyau au sein de la cellule et contribuent à la solidité cellulaire. Ils interviennent également dans la cohésion des cellules dans les tissus. Les filaments intermédiaires existent uniquement chez les animaux pluricellulaires mais ne sont pas présents dans toutes les cellules : les oligodendrocytes en sont par exemple dépourvus.

- Les microtubules, dernier type de filament, nous intéresseront plus particulièrement dans ce manuscrit. Les microtubules sont des polymères creux de 25 nm de diamètre, dynamiques et polarisés. Ce sont des éléments fondamentaux des cellules eucaryotes qui assurent des fonctions essentielles. Ils s'organisent soit en « réseau » soit en « fuseau ». Le « réseau » microtubulaire constitue une armature solide permettant la définition de l'architecture cellulaire basique, mais il participe également à l'extension et la migration cellulaire. Ce réseau contribue aussi au transport intracellulaire puisqu'il constitue un véritable échafaudage pour les moteurs moléculaires qui transportent des vésicules et autres cargaisons. D'autre part, en formant le « fuseau » mitotique, les microtubules assurent la ségrégation des chromatides sœurs lors de la mitose et celle des chromosomes lors de la méiose. Enfin, les microtubules sont également le constituant majoritaire de structures appelées des axonèmes qui forment les cils primaires - organelles impliquées dans la signalisation cellulaire et le développement - ainsi que les cils motiles (ou flagelles).

Ces microtubules montrent une variabilité importante de structures et fonctions nécessitant une régulation spatiotemporelle précise. Il existe deux degrés de régulation ; d'une part au niveau génétique avec la transcription de différentes isoformes de tubuline et d'autre part au niveau de la protéine avec les modifications post-traductionnelles des microtubules. Les modifications posttraductionnelles des protéines possèdent deux avantages : elles sont rapides car elles ne nécessitent pas la synthèse de protéines et elles sont réversibles. Elles influencent ainsi instantanément la fonction de la protéine. La tubuline est le substrat de nombreuses modifications très variant qui permettent l'existence simultanée de microtubules différents qui supportent la diversité de leurs fonctions.

Durant ces quatre années, je me suis particulièrement intéressée aux modifications de la séquence primaire de la tubuline alpha dont les résultats seront présentés autour de deux articles. Le

7

premier article, qui concentre la majorité de mes travaux de thèse, concerne le cycle de détyrosination/tyrosination et plus précisément l'identification et la caractérisation des Tubuline CarboxyPeptidases. Le second article, dont les travaux ont été réalisés en parallèle, présente la mise en évidence de nouvelles modifications post-traductionnelles de la tubuline. Ces articles, précédés d'une introduction générale, seront chacun suivi d'une discussion ainsi que d'une conclusion. Le manuscrit sera clôturé par une discussion générale soulevée par l'ensemble des travaux décrits.

Sommaire

INTRODUCTION

Chapitre I : Les microtubules

1.	Pro	priéte	és générales des microtubules	15
	1.1.	Stru	icture d'un microtubule	15
	1.2.	Les	tubulines	16
	1.3.	Nuc	léation	18
	1.4.	Dyn	amique intrinsèque des microtubules	19
	1.4.	1.	Le treadmilling	19
	1.4.	2.	L'instabilité dynamique	20
2.	Org	anisa	tions structurales des microtubules et fonctions cellulaires associées	21
	2.1.	Le r	éseau interphasique	21
	2.2.	Le f	useau mitotique	22
	2.3.	L'ax	onème	23
3.	Les	parte	enaires protéiques des microtubules	23
	3.1.	Les	MAPs structurales	25
	3.2.	Les	+TIPs	25
	3.3.	Les	-TIPs	25
	3.4.	Les	protéines déstabilisatrices	26
	3.4.	1.	Les moteurs dépolymérisants	26
	3.4.	2.	Les « severing proteins »	26
	3.4.	3.	Les séquestratrices	26
	3.5.	Les	moteurs moléculaires	27
	3.5.	1.	Les kinésines	27
	3.5.	2.	Les dynéines	27
4.	Dive	ersific	cations des microtubules comme élément de régulation	28
	4.1.	La d	liversification par les gènes	28
	4.2.	Les	modifications post-traductionnelles	28

Chapitre II : Le cycle de détyrosination/tyrosination

1.	Introduc	tion générale	33
2.	Les enzy	mes impliquées	34
	2.1. La T	ΤL	34
	2.1.1.	Historique de la découverte	34
	2.1.2.	Mécanismes, spécificité et caractéristiques biochimiques	35
	2.2. La T	CP	36

	2.2.1.	Historique de la découverte	36
	2.2.2.	Mécanismes, spécificité et caractéristiques biochimiques	36
	2.2.2.1	. Caractéristiques biochimiques	36
	2.2.2.2	2. Action sur le polymère, une caractéristique intrinsèque ?	37
	2.2.2.3	8. Classe d'enzyme	37
	2.2.2.4 TCP ?	. Modulateurs de la détyrosination : pierre d'achoppement de la purification d	e la 38
3.	Les impa	cts du cycle de détyrosination/tyrosination	39
	3.1. Imp	acts physiologiques	39
	3.1.1.	Dérégulation en cellules cancéreuses	39
	3.1.2.	La souris KO TTL, révélation du rôle vital de cette enzyme	41
	3.1.3.	Dans le cœur et la contraction musculaire	41
	3.2. Imp	lications cellulaires	43
	3.2.1.	Répartition et particularité des microtubules détyrosinés	43
	3.2.2.	L'organisation intracellulaire	45
	3.2.2.1	. Ancrage de l'appareil de Golgi et support du noyau ?	45
	3.2.2.2	2. Organisation des filaments intermédiaires	46
	3.2.3.	Le transport intracellulaire	47
	3.2.4.	La division cellulaire	47
	3.2.5.	La différentiation/morphogénèse cellulaire	49
	3.2.6.	La motilité	50
	3.3. Imp	acts moléculaires de la détyrosination	51
	3.3.1.	Caractéristiques intrinsèques des espèces	51
	3.3.1.1	. Vitesse de polymérisation in vitro	51
	3.3.1.2	2. Stabilisation et détyrosination : l'œuf ou la poule ?	51
	3.3.2.	Cap-Gly +TIPs protéines	52
	3.3.3.	Kinésine-13	52
	3.3.4.	Kinésine-1	53
	3.3.5.	CENP-E/Kinésine-7	53
	3.3.6.	Vue d'ensemble	54
4.	Un cas pa	articulier : le neurone	54
	4.1. Orga	anisation générale du cytosquelette microtubulaire neuronal	55
	4.2. Rép	artition des microtubules tyrosinés et détyrosinés	56
	4.3. Imp	lication de ces modifications dans la physiologie	56
	4.3.1.	L'établissement de la polarisation et son maintien	56
	4.3.2.	L'initiation du transport rétrograde	58
	4.3.3.	Pousse axonale et régénérescence nerveuse	60
	4.3.4.	Vue d'ensemble	61

Chapitre III : Les modifications consécutives à la détyrosination

1.	La t	ubuli	ne alpha delta-2	63
	1.1.	La d	lécouverte de la tubuline non-tyrosinable, la NTT	63
	1.2.	Les	enzymes impliquées dans la génération de la tubuline delta-2	64
	1.3.	Cara	actéristiques physiologiques et implications cellulaires de la tubuline alpha delta	-2.65
	1.3.	1.	Localisation de la tubuline alpha delta-2	65
	1.3.	2.	Implication physiologique moléculaire	65
	1.3.	3.	La tubuline alpha delta-2, une modification irréversible ?	65
2.	Et p	ourq	uoi pas une tubuline delta-3 ?	66

RESULTATS ET DISCUSSIONS

Article n°1:

«	Vaso	hibins/SVBP are Tubulin CarboxyPeptidases (TCP) that regulate neuron differentiation »	
	1.	Introduction	. 71
	2.	Résultats	. 71
	Stra	tégie de purification et identification d'un candidat « TCP » potentiel, la vasohibine-1	. 71
	Les	vasohibines sont capables de détyrosiner et déphénylalaniner la tubuline alpha	. 72
	Les	vasohibines sont impliquées dans la différenciation neuronale et le développement cérébral.	. 73
	3.	Discussion et perspectives	. 74
	4.	Conclusions	. 79
	5.	Article n°1	. 79

Article n°2:

1. In	troduction	117
2. R	ésumé	117
Spécificité d	le l'anticorps 3EG	117
Etude de la	présence et de la quantité physiologique de la tubuline delta-3	117
Mise en évi	dence de la formation de tubuline delta-3 par certaines CCPs	118
Régulation	de la génération de la tubuline alpha delta-3	118
Découverte	d'une tubuline beta tronquée	119
3. D	iscussion et perspectives	119
4. Co	onclusion	121
Article n°2.		
CONCLUSION	GENERALES	

ANNEXE

Complément d'information attaché à la partie « Article n°1 » :

1.	Les	vasohibines, des protéines connues	. 147
	1.1.	Identification des vasohibines 1 et 2	. 147
	1.2.	Des expressions tissulaires faibles mais ubiquitaires ?	. 147
	1.3.	Isolation de la Small Vasohibin Binding Protein (SVBP), un partenaire essentiel	. 148
	1.4.	Les souris invalidées pour chacune de ces protéines sont viables	. 148
	1.5.	Rôles des vasohibines dans l'angiogénèse	. 148
	1.6.	Implication dans le cancer	. 149
	1.7.	Une possible activité catalytique	. 150
2.	Con	clusion	. 150

INTRODUCTION

Chapitre I : Les microtubules

1. Propriétés générales des microtubules

1.1. Structure d'un microtubule

Les microtubules sont des polymères cylindriques d'environ 25 nm de largeur et pouvant aller de quelques microns à plusieurs centaines de microns de long. Ils sont constitués par l'assemblage d'une unité hétérodimérique formée de tubuline alpha et beta couramment appelée dimère de tubuline. En s'associant longitudinalement, les dimères forment des protofilaments qui s'associent ensuite de manière latérale pour former un feuillet qui une fois recourbé sur lui-même formera le microtubule (**Figure 2c**). La rencontre des protofilaments de l'extrémité du feuillet lors de ce recourbement forme ce qu'on appelle le sillon (**Figure 2d**, pointillés rouges). Le nombre de protofilaments semble maintenu à 13 *in vivo* (Evans et al, 1985 ; Tilney et al. 1973) même si la variabilité du nombre observé *in vitro* est plus large (de 9 à 17, Chrétien and Wade 1991).



Figure 2 : Structure d'un microtubule. Les héterodimères d'alpha et betatubuline (a) s'associent longitudinalement pour former les protofilaments (b) qui s'associent eux-mêmes latéralement lors de la polymérisation pour former le microtubule (c). La jointure des protofilaments est le sillon représenté par les pointillés rouges (d). (Adapté de *Essentials of Cell Biology, Nature Education*)

L'asymétrie du dimère de tubuline génère la polarité du microtubule : il possède une extrémité dite « moins » exposant l'alpha-tubuline et une extrémité dite « plus » présentant la beta-tubuline qui ont été désignées ainsi par leur propension à polymériser et dépolymériser. En effet, *in vitro* les deux extrémités d'un microtubule peuvent croître cependant le bout « plus » polymérise plus vite et

dépolymérise plus souvent (Walker et al. 1988) tandis que l'extrémité « moins » montre une faible dynamique. Dans la cellule, cette extrémité « moins » est généralement ancrée à un centre organisateur limitant sa dynamique (voir paragraphe 1.3.).

1.2. Les tubulines

La super-famille des tubulines se compose de sept familles de gènes: les tubulines alpha, beta, gamma, delta, epsilon, zêta et êta. Parmi ces différentes familles, seules les tubulines alpha, beta et gamma sont conservées chez les Eucaryotes et sont essentielles à la polymérisation de microtubules, le dimère de tubuline alpha et beta étant le constituant élémentaire des microtubules et la tubuline gamma celle nécessaire à leur nucléation. Les familles de tubulines delta, epsilon, zêta et êta, découvertes plus récemment semblent liées aux fonctions ou à la réplication des centrioles et des corps basaux (Dutcher, 2001).

Au cours de l'évolution, la complexification des familles de gènes des tubulines alpha et beta coémerge avec la sophistication des structures microtubulaires (Ludueña, 2013). Chez les eucaryotes supérieurs on dénombre par exemple huit alpha et sept beta contre deux alpha et une beta chez la levure. Les tubulines alpha et beta sont des protéines d'environ 450 acides aminés qui présentent des homologies superposables de leur structures (Löwe et al. 2001). Les tubulines alpha et beta possèdent un site de fixation pour le nucléotide GTP, cependant seule la tubuline beta est capable de l'hydrolyser en GDP et phosphate inorganique (**Figure 3a**). Cette réaction est directement impliquée dans la stabilité du microtubule (voir paragraphe 1.4.2).

Les homologies de séquences au sein d'une même famille sont généralement supérieures à 90 %, la spécification des isoformes se situant principalement sur la séquence carboxy-terminale (**Figure 3b**). Ces extrémités, qui forment ce que l'on appelle les queues C-terminales des tubulines, sont flexibles et émergent de la structure microtubulaire constituant une sorte de peigne à sa surface (**Figure 3c**). Elles sont particulièrement riches en acides aminés chargés négativement et sont le socle de la majorité de modifications post-traductionnelles des microtubules (Roll-Mecak 2015, voir paragraphe 4.2). Ces queues C-terminales ont ainsi un rôle prépondérant dans la régulation des interactions des microtubules avec leurs partenaires protéiques et, par conséquent, pour leur régulation fonctionnelle.



Figure 3 : Structure de la tubuline et variabilité des queues C-terminales. (a) Représentation en ruban (gauche) et rendu de surface (droite) des tubulines alpha et beta sans leur queue C-terminale.(b) Séquences C-terminales des tubulines alpha et beta humaines. Cette partie de leur séquence primaire la moins conservée participe à la définition des isoformes. Elle est riche en acides aminés négativement chargés (orange et rouge). (c) Modélisation d'un microtubule et de la queue C-terminale émanant de la paroi. Les points en couleurs symbolisent différentes modifications post-traductionnelles générant une diversité de surface (Adapté de Gadadhar et al. 2017; Roll-Mecak 2015)

1.3. Nucléation

Dans les cellules, la nucléation des microtubules requière généralement un centre organisateur des microtubules ou MTOC. Dans les cellules de Mammifères en interphase, le centrosome est le centre organisateur majeur des microtubules. Celui-ci est constitué de deux centrioles, composés chacun de neuf triplets de microtubules disposés de manière orthogonale et englobés par du matériel péricentriolaire amorphe (**Figure 3**).



Figure 3 : Représentation schématique du centrosome. (a) Les centrioles constitués de neuf triplets de microtubules sont entourés de matériel péricentriolaire contenant les structures annulaires de gamma-tubuline ou gamma-TuRC. Ces complexes sont le socle de la nucléation des microtubules. Adapté du livre « La cellule et les tissu » de Gerard Tachdjian publié chez Elsevier Masson.

Ce matériel péricentriolaire présente un grand nombre de structures appelées gamma-TuRC pour gamma-Tubulin Ring Complex. Ce sont des structures en spirale conique formant des anneaux de gamma-tubuline de 25nm de diamètre qui agissent comme échafaudage lors du processus de nucléation des dimères de tubulines. Retrouvés également à l'extérieur des centrosomes, ces complexes gamma-TuRC constituent les éléments fonctionnels majoritaires de la nucléation des microtubules des cellules mammifères. Ce complexe couvre et stabilise les bouts « moins » des microtubules alors que l'extrémité « plus » dynamique polymérise et dépolymérise, explorant le cytoplasme. Deux modèles décrivent aujourd'hui la fonction nucléatrice des gamma-TuRC. Le modèle favori est celui du « template » dans lequel l'anneau imitant la structure d'un microtubule agirait comme une amorce de polymérisation (**Figure 3a**). Un deuxième modèle plus controversé propose

qu'émane du gamma-TuRC un protofilament de gamma-tubuline sur lequel les dimères viendraient s'associer de manière latérale (**Figure 4b**, Job et al. 2003).



Figure 4 : Modèles de nucléation d'un microtubule par le complexe gamma-TuRC. (a) Dans le modèle de « template » la tubuline gamma (vert) s'associe sur le complexe gamma-TuRC (violet/orange) et forme un pattern sur lequel les dimères de tubulines viendront s'associer via la tubuline alpha (bleu). (b) Le second modèle propose qu'émane de la structure gamma-TuRC un protofilament de tubuline gamma sur lequel le dimère viendrait s'associer longitudinalement (Job et al. 2003).

In vitro, la nucléation et subséquente polymérisation de tubuline peut se faire spontanément sans nécessiter de centre organisateur en conditions appropriées c'est à dire lorsque l'on se trouve à pH proche de 7, autour des 35°C, en présence de GTP, magnésium, ainsi qu'à une concentration supérieure à la celle critique pour les conditions expérimentales définies.

1.4. Dynamique intrinsèque des microtubules

La dynamique du réseau microtubulaire est au cœur de la régulation fonctionnelle de celui-ci et la régulation spatio-temporelle de la stabilité des microtubules est fondamentale à la physiologie cellulaire. Deux théories basées sur les propriétés intrinsèques des microtubules expliquant les mouvements des microtubules en cellules coexistent ; le « treadmilling » ou effet de tapis roulant décrit par Margolis et Wilson en 1978 et l'instabilité dynamique proposée par Mitchison et Kirschner en 1984 (Desai and Mitchison 1997; Margolis and Wilson 1978; Mitchison and Kirschner 1984)

1.4.1. Le treadmilling

Le « treadmilling » est un phénomène expliqué par la différence de dynamique des extrémités « moins » et « plus » des microtubules. Il s'observe lorsque une extrémité « moins » est générée par détachement du MTOC ou après une coupure. L'extrémité « moins » dépolymérise alors librement tandis que de nouveaux dimères s'associent au bout « plus ». La longueur du microtubule restant constante, on observe un « déplacement » des dimères nouvellement ajoutés au sein des microtubules du bout « plus » vers le bout « moins » faisant l'effet d'un tapis roulant (**Figure 5a**).

1.4.2. L'instabilité dynamique

Une autre propriété intrinsèque des microtubules est leur instabilité dynamique. Il s'agit du phénomène découvert en 1984 par Mitchison et Kirschner par lequel un microtubule croît et/ou rétrécit par l'alternance de phases de polymérisation et dépolymérisation. Le passage de la polymérisation à la dépolymérisation est appelé « catastrophe », le phénomène inverse est un « sauvetage ». L'instabilité dynamique se mesure par les quatre paramètres que sont le taux de polymérisation, celui de dépolymérisation, la fréquence des catastrophes et celle des sauvetages (**Figure 5b**).

Deux paramètres influençant cette instabilité dynamique *in vitro* ont été mis en évidence ; la concentration locale en tubuline et l'hydrolyse du GTP. L'hydrolyse du GTP en GDP et phosphate inorganique par la sous-unité beta est un évènement stochastique dont la probabilité d'occurrence augmente avec le vieillissement des microtubules. La conformation du dimère est modifiée selon que la tubuline beta fixe un GTP ou un GDP. En effet, lorsque celle-ci fixe un GTP, la configuration droite du dimère favorise la polymérisation. A l'inverse, le relargage du phosphate impose une tension de courbure au dimère. Ainsi, lorsque l'hydrolyse du GTP est plus lente que l'ajout de dimère à l'extrémité « plus », la partie polymérisée présente une « coiffe » de tubuline-GTP qui maintient l'état de polymérisation. A l'inverse, lorsque l'hydrolyse du GTP est plus rapide que l'addition de dimères, la perte de la coiffe GTP entraine la courbure des dimères et la déstabilisation de leurs interactions latérales au bout « plus » résultant en la dépolymérisation « en peau de banane » du microtubule. L'hydrolyse du GTP est un facteur majeur de ce phénomène puisque lorsque l'on remplace du GTP par un homologue non-hydrolysable, le GMPCPP, les microtubules ne subissent plus de catastrophes et l'instabilité est abolie (Hyman et al. 1992).

Physiologiquement, le phénomène d'instabilité dynamique ou cycle de polymérisationdépolymérisation est impliqué dans le mécanisme de « recherche et capture ». Il s'agit de l'exploration du cytoplasme par les microtubules à la recherche de partenaires fonctionnels permettant leur persistance. C'est le cas par exemple des microtubules mitotiques qui polymérisent et dépolymérisent jusqu'à entrer en contact avec les kinétochores, structures permettant aux microtubules de tracter les chromosomes lors de la mitose (voir paragraphe 2.2). De manière plus générale, cette instabilité dynamique donne une réelle plasticité à l'organisation des microtubules cellulaires, le réseau microtubulaire, en autorisant son réarrangement rapide et efficace lors de changement d'état de la cellule.

20



Figure 5 : Dynamique intrinsèque des microtubules. (a) Schématisation de l'effet de « tapis roulant » observé *in vitro* lors de la polymérisation du bout « plus » et la dépolymérisation du bout « moins ». (b) Instabilité dynamique des microtubules. (Adapté de Steinmetz and Akhmanova 2008)

2. Organisations structurales des microtubules et fonctions cellulaires associées

2.1. Le réseau interphasique

Dans les cellules interphasiques, les microtubules sont organisés en réseau. La majorité des cellules de Mammifères présentent des microtubules centrosomaux - émanant des complexes gamma-TuRC localisés au centrosome - qui forment un réseau radial rayonnant sur l'ensemble de la cellule, et exposant leurs extrémités « plus » vers la périphérie. Cependant, certains types de cellules polarisées comme les cellules épithéliales, les neurones et les cellules musculaires possèdent des microtubules dits non-centrosomaux (pour revue voir Dammermann et al. 2003). Ces microtubules qui n'émanent pas du centrosome arborent une organisation propre à chaque type cellulaire. Les cellules épithéliales par exemple montrent une organisation apico-basale avec l'extrémité « moins » des microtubules orientés vers le pôle apical (**Figure 6**). Bien que de certains travaux révèlent l'implication des gamma-TuRC, les mécanismes de nucléations et d'ancrages des microtubules non-centrosomaux restent encore mal connus. Ces microtubules non-centrosomaux auraient un rôle dans le transport polarisé et seraient particulièrement impliqués dans la polarisation cellulaire (pour revue voir Nishita et al. 2017).



Figure Représentation 6: l'organisation schématique de microtubulaire interphasique de cellules fibroblastiques et épithéliales. vert sont représentés En les microtubules, en rouge le centrosome et en bleu le noyau. Contrairement aux cellules fibroblastiques (à gauche) qui ne sont pas polarisées, les cellules épithéliales (à droite) possèdent des microtubules non centrosomaux. (Adapté de Tang and Marshall, 2012)

L'ensemble des microtubules interphasiques participent à diverses fonctions vitales de la cellule. Ils jouent tout d'abord un rôle structural en participant à la définition de la forme cellulaire et à l'organisation intracellulaire en positionnant le noyau, les mitochondries, l'appareil de golgi, le réticulum endoplasmique, les endosomes et les lysosomes. Le réseau interphasique permet également le transport intracellulaire de cargaisons et vésicules via les moteurs moléculaires. Enfin, comme évoqué précédemment, les microtubules peuvent former une sous-structure appelée «bundles » ou faisceaux. Il s'agit d'un assemblage parallèle de microtubules organisés par les Microtubules Associated Proteins (MAPs, voir paragraphe 3) générant une stabilité et une rigidité accrues qui favorisent alors le transport intracellulaire. Cette organisation en « bundle » est notamment retrouvée dans les neurites des neurones ou encore dans le corps intermédiaire de cellule en division.

2.2. Le fuseau mitotique

Lorsque la cellule entre en mitose, le réseau interphasique dépolymérise. Les centrosomes se dupliquent et se séparent pour former deux pôles ou « aster ». A partir de ces centrosomes polymérise le fuseau mitotique. Celui-ci est constitué de trois types de microtubules. Premièrement, les microtubules dits kinétochoriens qui s'associent solidement aux kinétochores des chromosomes et permettent la séparation et ségrégation des chromatides sœurs. Ensuite, les microtubules polaires qui se chevauchent au centre du fuseau et via les moteurs moléculaires maintiennent séparés les deux pôles et régulent l'élongation du fuseau lors de l'anaphase. Enfin les microtubules dits astraux qui dirigés vers la membrane orientent et positionnent le fuseau mitotique, par son positionnement régule également l'orientation de la division dans le tissu. Cette orientation contrôle l'asymétrie de la division qui impacte le devenir des cellules filles. Enfin, lors de la cytokinèse les microtubules participent à la formation du « corps intermédiaire », une structure transiente et contractile

nécessaire à l'abscission des cellules filles.

2.3. L'axonème

Les cils et flagelles sont des organelles composées d'un axonème. Cette structure microtubulaire particulière polymérise à partir d'un corpuscule basal (Figure 7b). Elle est constituée de 9 doublets de microtubules A et B, A étant un microtubule complet de 13 protofilaments et B incomplet, n'en comptant que 10 à 11. Ces doublets sont associés entre eux par des bras de dynéines qui sont des moteurs moléculaires (voir paragraphe 3.5.2). L'activité de ces dynéines génère un « glissement » des microtubules engendrant alors le mouvement de l'organite. Le flagelle est purement moteur et permet aux protozoaires et spermatozoïdes par exemple de se déplacer dans un liquide grâce au mouvement ondulatoire de l'axonème. Les cils eux, se distinguent en deux catégories, les cils primaires et les cils motiles. Les cils primaires sont des organelles senseurs présents à la surface des cellules interphasiques. Ils reçoivent des stimuli mécaniques ou chimiques et les transmettent au noyau. Les cils motiles, généralement nombreux à la surface cellulaire tels que sur les cellules épendymaires ou les cellules ciliées des voies respiratoires, battent en rythme permettant la circulation efficace de liquide, ici céphalorachidien ou muqueux.



Figure 7 : Représentation schématique de l'organisation microtubulaire du fuseau mitotique (a) et d'un flagelle (b). (a) Illustration de Georges Dolisi et (b) adaptation d'illustration de Wikipédia.

Les microtubules soutiennent un large nombre de fonctions qui nécessitent des structures ainsi que des dynamiques variant au sein même d'une cellule. Ces structures sont en grande parties modulées par leurs partenaires protéiques.

3. Les partenaires protéiques des microtubules

Des protéines étaient initialement définies comme Microtubules Associated Protein ou MAP, par leur capacité à co-purifier avec la tubuline (Olmsted et al. 1984). Aujourd'hui, le terme de MAP s'applique à toute protéine interagissant spécifiquement avec la tubuline ou les microtubules. On les distingue en cinq grandes familles: les MAPs dites structurales ou stabilisatrices, les protéines déstabilisatrices, les « + » End Tracking Protein ou + TIPs, les « - » End Tracking Proteins ou - TIPs et enfin les moteurs moléculaires (**Figure 8**).



Figure 8 : Vue d'ensemble des grandes familles de MAPs : les MAPs déstabilisatrices, les MAPs stabilisatrices, les « + » TIPS, les « - » TIPS et les moteurs moléculaires. (A partir d'éléments de Janke et al., 2012)

3.1. Les MAPs structurales

Les MAPs stabilisatrices ou structurales sont des protéines capables de s'associer le long de la paroi des microtubules. Elles affectent directement la stabilité en modifiant au moins l'un des quatre paramètres de leur dynamique. Certaines MAPs sont également capables de co-organiser des microtubules parallèlement en « bundles ». Les MAPs structurales présentent de manière générale des domaines d'interactions aux microtubules redondants et leur association avec la paroi est généralement régulée par leur état de phosphorylation. Parmi les MAPs dites « classiques », les membres des familles de Tau/MAP2 et de MAP1 sont les plus étudiés. Nous pouvons retrouver également la famille des MAP6 qui possède la particularité de protéger les microtubules de la dépolymérisation à froid (pour revue voir Amos and Schlieper 2005). Il faut noter que s'il est traditionnellement accepté que les MAPs structurales aient pour rôle de stabiliser les microtubules, des preuves s'accumulent suggérant que ces protéines pourraient également soutenir d'autres fonctions. Tel est le cas de TPX2 ou Doublecortin qui génèrent la nucléation de nouveaux microtubules (Brunet et al. 2004; Gruss et al. 2002; Moores et al. 2004), ou de Tau capable de coorganiser les réseaux d'actine et microtubules par exemple (Elie et al. 2015). Elles peuvent également intégrer des cascades de signalisation indépendamment de leurs fonctions microtubulaires telle que MAP6 qui intervient dans la signalisation de la sémaphorine3E (Deloulme et al. 2015).

3.2. Les +TIPs

Les protéines +TIPs sont une catégorie de MAPs constituée de sous-familles fonctionnellement et structuralement différentes qui se rassemblent par leur capacité à s'accumuler de manière spécifique au bout « plus » des microtubules. De manière générale les + TIPs ciblent les microtubules en polymérisation et forment ce que l'on appelle des comètes. Ces protéines se répartissent en une vingtaine de familles dont les principales sont les End-Binding proteins ou EBs, les protéines à domaine CAP-Gly (Cytoskeleton-Associated Protein Glycine-Rich), les protéines à séquence SxIP, et les protéines à domaine TOG et TOG-like (désignées par homologie à la protéine ch-TOG). De manière générale les +TIPs assurent deux grandes fonctions ; elles régulent positivement ou négativement la dynamique des microtubules et permettent les interactions avec d'autres structures telles que le cortex cellulaire, le réseau d'actine ou encore les kinétochores (pour revue voir Akhmanova and Steinmetz, 2010).

3.3. Les –TIPs

Nous l'avons vu, les deux extrémités d'un microtubule sont structuralement différentes et ne présentent pas le même taux de polymérisation/dépolymérisation. Il est généralement accepté que dans une cellule l'extrémité « moins » du microtubule ne polymérise jamais et lorsque les

microtubules sont relâchés des centres organisateurs elles restent stables ou dépolymérisent. Cette faible dynamique peut-être expliquée par la présence des –TIPs, dont seule une petite famille composée des protéines CAMSAPs est aujourd'hui connue. En s'associant à la paroi des microtubules les CAMSAPs inhibent spécifiquement la polymérisation et les catastrophes et figent donc les bouts « moins » qui serviront de racine stable pour la pousse ou l'élongation de microtubules non-centrosomaux (Hendershott and Vale 2014, pour revue voir Akhmanova and Hoogenraad 2015).

3.4. Les protéines déstabilisatrices

A l'inverse des MAPs favorisant une dynamique de croissance, les protéines déstabilisatrices ont pour mission de diminuer la longueur d'un microtubule ou la vitesse d'élongation, d'augmenter la fréquence des catastrophes ou de réduire celle des sauvetages. Selon leur mode d'action, les protéines déstabilisatrices se distinguent en trois grandes familles bien différentes.

3.4.1. Les moteurs dépolymérisants

Tout d'abord, la famille des kinésines-13 dont font partie MCAK pour Mitotic Centromere-Associated Kinesin et KIF2A présente la capacité de déstabiliser les bouts « plus » des microtubules. Ces kinésines possèdent une fonction ATPase nécessaire à leur activité de dépolymérases mais sont cependant incapables de naviguer de manière autonome le long du microtubule. Elles se déplacent uniquement par diffusion. Lorsque les domaines catalytiques fixent de l'ATP, les kinésines s'associent aux microtubules, l'hydrolyse de cet ATP génère alors un changement de conformation entrainant une courbure du microtubule qui favorise fortement la dépolymérisation du microtubule en « peau de banane » (pour revue voir Howard and Hyman 2007)

3.4.2. Les « severing proteins »

Les protéines de la famille des « severing proteins » ou protéines de coupure dans laquelle nous retrouvons la spastine, la katanine et la fidgetine, agissent d'une toute autre manière pour réduire la longueur du microtubule. Ces enzymes font partie de la famille des protéines AAA (adenosine triphosphatase associated with various cellular activities). En s'associant à la paroi du microtubule, elles génèrent un clivage de celui-ci en deux microtubules plus courts. En exerçant une force mécanique tirant sur la queue C-terminale, les enzymes déstabilisent les interactions tubuline-tubuline locales ce qui entraîne la cassure du microtubule (Roll-Mecak and Vale, 2008). Ce processus essentiel intervient notamment dans la génération de microtubules non-centrosomaux et lors de la cytokinèse (Yang et al. 2008, pour revue voir Roll-Mecak and McNally 2010; Sharp and Ross 2012).

3.4.3. Les séquestratrices

Enfin, comme nous l'avons évoqué plus tôt, la concentration locale en tubuline est un élément

de régulation de leur dynamique. Ainsi, en réduisant la concentration en tubuline libre, la famille des stathmines dites protéines de séquestration régule négativement le taux de polymérisation et favorise les catastrophes (Howell, Larsson, Gullberg, and Cassimeris, 1999). L'interaction des stathmines avec la tubuline libre est directement dépendante de leur taux de phosphorylation (pour revue voire Cassimeris 2002).

3.5. Les moteurs moléculaires

La majorité du transport intracellulaire actif est médiée par trois groupes de moteurs moléculaires. Les kinésines et les dynéines qui naviguent respectivement en direction des extrémités « plus » ou « moins » des microtubules, et les myosines non-conventionnelles qui se déplacent le long des filaments d'actine dont nous ne parlerons pas dans ce manuscrit.

3.5.1. Les kinésines

Les kinésines forment une très vaste famille de protéines qui sont pour la grande majorité des moteurs antérogrades et donc transportent les cargaisons vers la périphérie cellulaire. Les kinésines sont généralement dimériques et constituées de trois domaines : un domaine moteur possédant une activité ATPase nécessaire à la génération du mouvement, une superhélice centrale ou domaine coiled-coil impliqué dans la multimérisation ainsi qu'un domaine de liaison aux protéines adaptatrices nécessaires au recrutement de cargaisons. Tous les membres de la famille des kinésines possèdent un domaine moteur dont la position à l'intérieur de la séquence indique la direction de son déplacement. Ainsi, lorsque le moteur se situe en N-terminal celui-ci sera antérograde, c'est le cas de la majorité des kinésines dont les kinésines-1 dites conventionnelles. Lorsque ce domaine est codé en position C-terminal, les kinésines seront rétrogrades, c'est le cas de certaines kinésines-14B. Enfin lorsque le moteur est codé au centre de la séquence, cas des kinésines-13, celles-ci ne sont plus motiles et adoptent des fonctions de déstabilisation des microtubules (voir paragraphe 3.4.1, pour revue voir Hirokawa et al. 2009; Miki et al. 2005).

3.5.2. Les dynéines

Les dynéines sont des protéines multimériques qui appartiennent à la superfamille des protéines AAA. Elles sont généralement constituées d'une chaine lourde portant l'activité ATPase, et de deux chaines (une légère et une intermédiaire) permettant les interactions protéiques. Les dynéines se séparent en deux classes, les dynéines axonémales et les dynéines cytoplasmiques. Dans les axonèmes, les bras des dynéines sont responsables du mouvement des flagelles et des cils. En effet, deux rangées de dynéines sont associées solidement aux tubules A et « courent » de manière coordonnée et le long des tubules B des doublets voisins. Cela génère une torsion des microtubules et en conséquence l'oscillation du flagelle. Les dynéines cytoplasmiques sont quant à elles

responsables du trafic intracellulaire rétrograde. On trouve deux formes, la dynéine-1 qui assure le transport cytoplasmique et la dynéine-2 impliquée dans le transport intra-flagellaire (IFT) (pour revue voir Cianfrocco et al. 2015; Hou and Witman 2012; Jha and Surrey 2015).

4. Diversifications des microtubules comme élément de régulation

La diversité des rôles et des structures des microtubules pose la question de leur spécialisation individuelle au sein des cellules. Nous pouvons distinguer deux niveaux de diversification qui interviennent dans leur régulation fonctionnelle : au niveau génomique avec l'existence de plusieurs isoformes de tubulines alpha et beta et au niveau protéique avec les modifications posttraductionnelles des diverses tubulines.

4.1. La diversification par les gènes

Au cours de l'évolution, la famille des gènes des tubulines s'est amplifiée. On trouve chez la levure *Saccharomyces Cerevisiae*, seulement deux gènes de l'alpha et un gène de beta-tubuline, alors que ce nombre dépasse généralement six chez les vertébrés. La complexification de cette famille de gènes multicopies coémerge avec la sophistication des structures microtubulaires. L'hypothèse selon laquelle un isotype possède une ou des fonctions distinctes participant à la spécialisation microtubulaire est proposée en 1976 par Fulton et Simpson sous le nom d' « hypothèse multi-tubuline ». Cette idée est soutenue par l'observation de profils d'expressions spatiotemporels différents des isoformes (pour revue voir Ludueña 2013).

Au niveau moléculaire, l'existence de ces isoformes trouve deux explications. Premièrement, l'étude d'isoformes de beta montre que celles-ci peuvent posséder des caractéristiques conférant des propriétés dynamiques différentes aux microtubules (Panda et al. 1994). D'autre part, les isoformes peuvent montrer de manière intrinsèque par leur séquence primaire, ou extrinsèque par leur susceptibilité aux modifications post-traductionnelles, des affinités différentes avec les partenaires des microtubules (Larcher et al. 1996; Redeker et al. 1998; Redeker 2010; Silva et al. 2017; Sirajuddin et al. 2014). Néanmoins, les informations accumulées ne permettent pas encore d'établir un schéma clair des caractéristiques et fonctions spécifiques à chaque isoforme et de nombreuses questions sur l'expression de ces gènes, la spécificité d'association des tubulines alpha et beta en dimère, ou encore la coexistence de ces formes au sein d'un microtubule restent aujourd'hui en suspend.

4.2. Les modifications post-traductionnelles

Le second degré de diversification des microtubules passe par leurs modifications posttraductionnelles ou MPTs. Il s'agit de modifications rapides et réversibles ayant pour objet la modification des propriétés d'une protéine par l'ajout ou la suppression d'un groupement chimique ou acide aminé sur un résidu défini d'une protéine cible. Il peut également s'agir de protéolyse irréversible. La tubuline est sujette à de nombreuses MPTs dont la nature est très variable. En cellule, la majorité de ces modifications est observé sur le polymère et préférentiellement sur des microtubules dits stables. Ces modifications et polymodifications créaient une importante diversité microtubulaire. Une grande partie de ces modifications a lieu sur la queue C-terminale des tubulines qui est donc exposée à la surface des microtubules. L'ajout ou la suppression d'acides aminés va alors impacter les interactions avec les partenaires protéiques des microtubules.

Les modifications post-traductionnelles de la tubuline comprennent le cycle de détyrosination/tyrosination et la génération de tubuline delta-2 et delta-3, la polyglutamylation, la polyglycylation, la phosphorylation, la polyamination ainsi que l'acétylation (**Figure 9**). Les enzymes responsables de ces modifications ainsi que les principales implications moléculaires et physiologiques connues sont résumées sous forme de tableau (**Tableau 1**, pour revue voir Gadadhar et al. 2017; Hammond et al. 2010; Yu et al. 2015).

L'objet principal de ce manuscrit qu'est le cycle de détyrosination/tyrosination sera détaillé en profondeur dans le chapitre suivant, et nous aborderons les modifications consécutives ; la tubuline delta-2 et delta-3 dans le chapitre III.



Figure 9: Vue d'ensemble des modifications post-traductionnelles des tubulines alpha et beta les plus étudiées. La tyrosination (GEEY, rouge), la détyrosination (-GEE, vert), la déglutamylation du Cl'alpha terminus de tubuline générant les tubulines delta-2 (-GE, delta-3 (-G, rose) et gris), l'acétylation (Ac), la polyamination (Am), la polyglutamylation (E, bleu), et la polyglycylation (G, vert) sont représentées sur les tubulines alpha (gauche) et beta (droite). (Adapté de Namba et al. 2015)

Tableau 1 : Récapitulatif des modifications post-traductionnelles des tubulines alpha et beta, des enzymes responsables et de leurs implications physiologiques connues.

Premières publications	Référencées dans le chapitre II	Référencées dans le chapitre III	Modification et Enzymes: Berezniuk et al., 2013 Aillaud et al., 2016	Modifications : Edde et al., 1990 Redeker et al., 1991 Enzymes : Regnard et al., 2003 Janke et al., 2010 Rogowski et al., 2010 Tort et al., 2014
Implications physiologiques	Rôle vital de la tyrosination. Implication dans la mitose, la différenciation neuronale, la physiologie cardiaque et le développement cérébral.	Marqueur cellulaire de malignité dans certains cancers. Enrichie après lésion axonale au niveau du site de coupure ainsi que dans les cardiomyocytes de rat après arrêt cardiaque.	×	Nécéssaire à la formation et aux bâtements des flagelles et cils, à l'extension neuritique. L'hyperpolyglutamylation est liée à la neurodégénérescence.
Rôles moléculaires	Régule l'association et localisation des moteurs conventionnels Kinésine-1, dépolymérisants Kinésine-13 et des +TIPs à CAP-Gly. La détyrosination est un marqueur de stabilité. <i>Voir chapitre</i> <i>II</i> .	Fortement enrichie sur microtubules neuronaux et axonémaux. Marqueur des microtubules stables. Pas d'interactant moléculaire spécifique décrit. <i>Voir chapitre III.</i>	Présence uniquement dans les cellules neuronales, enrichie chez l'embryon. Pas d'interactant moléculaire spécifique décrit. <i>Voir chapitre III</i> .	Régule l'association de moteurs moléculaires Kinésine-1, des MAPs structurales MAP2 et Tau ainsi que de la protéine de coupure Spastine.Enrichis sur microtubules neuronaux, centrioles, fuseau mitotique. Marqueur de stabilité. Voir revues Janke and Bulinski, 2011, Song and Brady, 2015
Enzymes réverses	Tubuline Tyrosine Ligase (TTL)	(2)	(2)	CCP1,2,3, 4,5,6
Enzymes responsables	Tubuline CarboxyPeptidases (TCPs) (dentifiées durant ma thèse)	Cytosoliques CarboxyPeptidases ou CCP1,2,3,4,6	CCP1,4,5,6	Tubulin Tyrosine Ligase Like ou TTLL1,4,5, 6,7,11,et 13
Descriptions	Clivage ou addition de la tyrosine C-terminale	Sur tubuline détyrosinée : clivage du glutamate C-terminal	Sur tubuline alpha delta- 2: clivage du glutamate C-terminal	Ajout d'un ou de plusieurs glutamates sur un glutamate de la séquence primaire
α/β	α	σ	α	α/β
Modifications	Détyrosination Tyrosination	Formation de tubuline delta-2	Formation de tubuline delta-3	Glutamylation

Modifications	α/β	Descriptions	Enzymes responsables	Enzymes réverses	Rôle moléculaire	Implications physiologiques	Premières publications
Glycylation	α/β	Ajout d'une ou de plusieurs glycines sur un glutamate de la séquence primaire	ТТЦЗ,8 et 10	(2)	Pas de fonctions moléculaires clairement définies. Pourrait participer à l'interaction entre microtubules de l'axonème et membranes Voir revues Janke and Bulinski, 2011, Song and Brady, 2015	Enrichies dans les cellules des organes ciliés.Importante pour la longeur, la stabilité et la fonction des cils motiles et la formation et le maintien des cils primaires.	Modifications : Redeker et al., 1994 Enzymes : Wloga et al., 2009 Rogowski et al., 2009
Acétylation	ъ	Ajout d'un groupement acétyl sur la lysine 40	MEC-17 (α-TAT1)	HDAC6, SIRT2	Marqueur de stabilité. Confère une flexibilité aux microtubules protégeant des cassures. Stabiliserait les interactions interprotofilament et régulerait le nombre de protofilaments <i>in vivo</i> . <i>Cueva et al., 2012, Portran et al.,</i> <i>Zueva et al., 2015</i> , <i>Portran et al.,</i> <i>Xu et al., 2017, voir revue Sadoul and</i>	Dérégulation associée à des pathologies neurologiques, des cancers et des maladies cardiaques.	Modifications : L'hernault et al., 1985 Enzymes : Shida et al., 2010 Akella et al., 2003 North et al., 2003
	В	Ajout d'un groupement acétyl sur la Iysine 252	San	(٤)	Modification sur le dimère, semble inhiber la polymérisation. <i>Chu et al., 2011</i>	×	Modifications et Enzymes: <i>Chu et al., 2011</i>
Polyamination	£	Ajout d'une polyamine (putrescine, spermine, and spermidine) sur la glutamine 15.	Transglutaminase (probablement TG2)	(2)	Enrichie sur les microtubules neuronaux. Stabilisation des microtubules et prévention de la dépolymérisation au froid ou en présence de calcium. Song et al., 2015	×	Modifications et Enzymes: Song et al., 2013
Phosphorylation	β	Ajout d'un groupement phosphate sur la serine 172	Cdk1	(2)	Inhibe la polymérisation. Fourest-Lieuvin et al., 2006	×	Modifications et Enzymes : Fourest-Lieuvin et al., 2006

Chapitre II : Le cycle de détyrosination/tyrosination

1. Introduction générale

Historique de la découverte du cycle

La tyrosination a été décrite pour la première fois en 1973 par l'équipe argentine de Caputto. Ils observèrent l'incorporation d'une tyrosine radiomarquée sur une séquence peptidique indépendante de l'activité des ribosomes. Cette tyrosination prédominante dans le cerveau (Barra et al. 1973) est alors décrite comme réversible. La même année cette équipe identifie un unique substrat tyrosiné qui peut également être phénylalaniné mais dont les deux réactions sont exclusives et s'inhibent réciproquement (Barra et al. 1973a). La tubuline alpha est finalement identifiée comme le substrat de ces réactions en 1975 (Barra 1974; Arce et al. 1975a; Arce et al. 1975b). De plus, alors qu'il avait été proposé dans un premier temps que les réactions d'ajout et de clivage de la tyrosine soient réalisées par une même protéine (Hallak et al.1977), les enzymes effectuant ces réactions furent finalement séparées par l'utilisation de protocoles de purifications distincts (Argaraña et al., 1978). Ces travaux permettront la description du premier élément de régulation de ces enzymes : l'état de polymérisation de la tubuline.

Vue d'ensemble du cycle

Le cycle de détyrosination/tyrosination s'effectue sur l'extrémité C-terminale de l'alpha tubuline. La majorité des gènes de l'alpha-tubuline code pour une tyrosine C-terminale (voir **Figure 3b**). Cette tyrosine peut être clivée par une enzyme appelée Tubuline CarboxyPeptidase ou TCP, enzyme dont la découverte et la caractérisation ont été l'objectif de mes travaux. Ce clivage génère de la tubuline dite détyrosinée (précédemment appelée Glu-tubuline) exposant alors un glutamate C-terminal sur lequel la TTL ou Tubuline Tyrosine Ligase ou TTL pourra de nouveau ajouter une tyrosine (**Figure 10**).

On admet aujourd'hui que dans les cellules, les microtubules sont les substrats préférentiels de la TCP et que la TTL agit uniquement sur le dimère de tubuline nouvellement dépolymérisé. Cette régulation différentielle des enzymes résulte en une absence totale de tubuline détyrosinée libre. La tubuline détyrosinée se trouve alors uniquement sur des microtubules persistants et en conséquence, en est un marqueur de stabilité.



Figure 10: Cycle de détyrosination/tyrosination. Le dimère de tubuline dont l'alpha est néosynthétisée avec une tyrosine C-terminale, est polymérisé en microtubule. Lorsque celui-ci persiste suffisamment longtemps, la Tubuline CarboxyPeptidase (TCP) clivera cette tyrosine générant la tubuline détyrosinée. La dépolymérisation libère le dimère qui sera le substrat de la Tubuline Tyrosine Ligase qui ajoutera à nouveau une tyrosine en position C-terminale. (Construite à partir d'élément de Janke et al., 2012)

2. Les enzymes impliquées

2.1. La TTL

2.1.1. Historique de la découverte

Rabin et Flavin seront les premiers à publier une purification partielle de la TTL à partir de cerveau en 1977 suivis de Murofushi en 1980 qui décrira une préparation proche de l'homogénéité (Raybin and Flavin 1977.; Murofushi 1980). Après amélioration de cette purification, des anticorps monoclonaux furent générés contre la TTL permettant l'établissement d'une purification d'affinité plus efficace (Schroder, Wehland, and Weber, 1985). L'étude des caractéristiques de cette protéine a alors démontré que la TTL avait comme substrat sélectif la tubuline sous sa forme dimérique (Raybin and Flavin 1977). L'enzyme sera définitivement identifiée et clonée après séquençage peptidique de la TTL de cochon (Ersfeld et al. 1993 pour revue voir Erck et al. 2000). La souris invalidée pour le gène de la TTL sera rapidement générée et soulignera l'importance de cette protéine et du cycle de détyrosination/tyrosination *in vivo* puisque les animaux meurent peu après leur naissance (Erck et al. 2005, voir paragraphe 3). Finalement, l'enzyme sera cristallisée en 2011 ainsi qu'en 2013 éclairant alors les mécanismes de sélectivité pour le dimère et de spécificité pour l'alpha-tubulin détyrosinée (Prota et al. 2013; Szyk et al. 2011).

2.1.2. Mécanismes, spécificité et caractéristiques biochimiques

Si la TTL a pour substrat préférentiel la tyrosine, la phénylalanine ainsi que la DOPA peuvent également être ajoutées *in vitro* au C-terminus de l'alpha-tubuline (Barra et al. 1973b; Rodriguez et al. 1975). Cependant, la TTL ayant une très faible affinité pour les autres acides aminés, il est raisonnable de penser que la tubuline cellulaire sera principalement tyrosinée, très peu phénylalaninée et qu'elle ne présentera quasi jamais de DOPA en position C-terminale. En conditions physiologiques la quantité de tubuline phénylalaninée ne dépasserait d'ailleurs pas les 4% de tubuline totale du cerveau de rat nouveau né (Rodriguez and Borisy 1979). Une seule étude récente montre que dans les neurones, la phénylalanine peut effectivement être intégrée sur la tubuline et qu'une augmentation de sa concentration dans le milieu de culture induit une phénylalanination anormale de la tubuline et résulte en une perturbation de la physiologie cellulaire (Ditamo et al. 2016).

La TTL est une ATPase qui possède un domaine N-terminal, un domaine central et un domaine C-terminal avec le site actif situé entre ces deux derniers domaines (Szyk et al. 2011). La spécificité de la TTL pour l'alpha tubuline sous forme dimérique s'explique de deux manières. Premièrement, elle s'associe de façon contiguë à la jointure des deux sous-unités reconnaissant alors la courbure du dimère libre (**Figure 11**). Elle interagit principalement avec l'alpha tubuline positionnant alors idéalement le site actif pour recevoir la queue C-terminale de cette sous-unité. De plus, contrairement à la beta tubuline, seule la queue C-terminale de l'alpha possède deux glutamates nécessaires à la fixation et au maintien de la séquence peptidique dans le site actif (Prota et al. 2013, **Figure 11b**). Ce modèle explique également l'insensibilité de la TTL à la polyglutamylation de la tubuline, qui tyrosine indifféremment la tubuline polyglutamylée ou non (Eddé et al. 1992). Aujourd'hui, aucun autre substrat physiologique de la TTL n'a été identifié, définissant le cycle de détyrosination/tyrosination comme exclusif à la tubuline alpha.


Figure 11 : La TTL tyrosine spécifiquement l'alpha tubuline détyrosinée dimérique indifféremment de son état de polyglutamylation. (a) Représentation de la TTL (bleu) associée à un dimère courbé (gauche) ou droit (droite). La TTL s'associe majoritairement avec l'alpha-tubuline (bas) permettant le positionnement de la queue C-terminale de cette dernière proche du site actif de l'enzyme. La flèche noire indique la séquence de la TTL (β 3– β 4 loop, en rouge) responsable de l'incompatibilité avec la tubuline polymérisée. **(b)** Schématisation de la séquence C-terminale des tubulines tyrosinée, détyrosinée et delta-2. La TTL nécessite les deux acides glutamiques C-terminaux permettant l'ancrage de la séquence dans le site actif. Le taux de polyglutamylation n'a pas d'effet sur l'activité de la TTL. (Adapté de Prota et al. 2013).

2.2. La TCP

2.2.1. Historique de la découverte

En 1978, Argaraña et ses collaborateurs séparent les activités de ligase et de carboxypeptidase de cerveau de rat en améliorant les protocoles de purification (Argaraña et al. 1978). Débute alors l'étude des caractéristiques biochimiques et des spécificités de la TCP. En 1980, ils proposent un nouveau protocole de purification à partir de cerveau de poulet et distinguent la TCP de la CarboxyPeptidase A, peptidase pancréatique également capable de cliver des tyrosines C-terminales, en démontrant leurs différences de sensibilité à de nombreux composés. De nouvelles tentatives de purifications furent proposées par la suite mais aucune n'aboutira à l'identification de l'enzyme (Kumar and Flavin 1981; Martensen 1982). Cependant, accompagnant ces recherches infructueuses, de nombreux travaux décrivant des caractéristiques de la TCP se sont accumulés permettant d'appréhender la complexité de la recherche de cette enzyme.

2.2.2. Mécanismes, spécificité et caractéristiques biochimiques

2.2.2.1. Caractéristiques biochimiques

Dans un extrait enrichi en activité passé à travers une colonne de gel filtration, l'activité TCP semble posséder un poids moléculaire de l'ordre de 90 kDa (Argarana et al. 1980). Quelques années plus tard la même équipe refit l'expérience en présence d'une forte concentration de sel (chlorure de

sodium) ayant pour conséquence la dissociation des interactions protéiques faibles. Ils décrivirent alors une protéine d'une masse d'environ 45-56 kDa, capable de s'associer avec une autre protéine pour former un complexe de 75 kDa possédant également l'activité (Weizetfel et al. 1997). Cette enzyme possèderait un pH isoélectrique aux alentours de 9.

L'activité enzymatique de la TCP est également sensible au pH qu'elle préfère aux alentours de 6,8, ainsi qu'au sel de sodium, les faibles concentrations favorisant son activité. Notons que la force ionique est un élément connu de modulation de l'association des MAPs avec les microtubules : au plus celle-ci est forte, au plus les MAPs se détachent du polymère (Vallee, 1982).

2.2.2.2. Action sur le polymère, une caractéristique intrinsèque ?

L'ensemble des données accumulées depuis 1977 concordent à proposer un mécanisme d'action préférentiel de la TCP sur le polymère. La toute première corrélation entre activité de détyrosination et polymérisation de la tubuline a été évoquée en 1977 (Hallak et al. 1977). L'ajout de sel, de calcium ou de colchicine, favorisant l'état dépolymérisé de la tubuline, stoppait l'activité de relargage de la tyrosine (Hallak et al. 1977; Arce et al. 1978; Arce and Barra 1985). Thompson et collaborateurs montrèrent que la quantité de tyrosine présente dans les microtubules des cellules était plus faible que dans la fraction de tubuline soluble, et que la présence de microtubules était nécessaire pour le clivage rapide de la tyrosine (Thompson et al. 1979). Plus tard, une fraction enrichie en TCP ajoutée à un mélange de tubuline libre ou polymérisée révèleront une détyrosination deux à dix fois plus importante sur le polymère que sur le dimère (Kumar and Flavin 1981; Arce and Barra 1983). L'association de la TCP avec les microtubules a également été démontrée par des successions de polymérisation et dépolymérisation de la tubuline, lors desquelles l'activité TCP cosédimente majoritairement avec les microtubules (Arce and Barra 1983; Webster et al. 1992). Enfin, lorsque la membrane cellulaire est perforée laissant s'échapper la fraction cytoplasmique, une apparition de microtubules detyrosinés est observée démontrant l'association de l'enzyme aux microtubules dans des cellules vivantes.

La détyrosination apparait alors préférentiellement sur la tubuline polymérisée. Cependant, la sélectivité intrinsèque de la TCP pour les microtubules reste hypothétique en l'absence de préparation purifiée (et cristallisée). Il pourrait en effet s'agir d'un élément de régulation ne dépendant pas directement de l'activité catalytique, telle qu'une protéine régulatrice par exemple.

2.2.2.3. Classe d'enzyme

Une question capitale dans l'étude de la TCP concerne le mécanisme de son site actif ou autrement dit, sa famille enzymatique. Il existe six grandes familles de peptidases principalement définies par l'élément initiateur de l'attaque nucléophile générant la coupure. Nous distinguons les protéases à sérine, à cystéine (ou à thiol), à acides aspartique ou glutamique, à thréonine et les métalloprotéases. Dans le cas des métalloprotéases, ce n'est donc pas un acide aminé (sérine, cystéine, thréonine, aspartate ou glutamate) qui initie l'attaque mais un cation métallique divalent qui activera une molécule d'eau qui elle-même attaquera le substrat. Il s'agit généralement d'un ion de zinc mais cela peut être également du cobalt, du manganèse ou du cuivre.

La TCP est aujourd'hui classée dans la famille des métallocarboxypeptidases (nomenclature IUPAC EC3.4.17.17). Cependant, l'activité de détyrosination est augmentée en présence d'EDTA, un chélateur de cations divalents (Argaraña et al. 1978; Argaraña et al. 1980) et l'addition de zinc, cobalt ou cuivre abolit complètement l'activité de l'enzyme (Webster and Oxford 1996). D'autre part, des éléments soutiennent l'importance d'une cystéine dans l'activité détyrosinase. Le premier élément se base sur l'inhibition irréversible de l'enzyme par deux composés réagissant avec les thiols : le N-éthylmaléimide et l'iodoacétamide (Webster and Oxford 1996). De plus, le parthénolide, inhibiteur de l'activité cellulaire de la TCP, possède une structure appelée alpha-beta lactone connue pour réagir avec les nucléophiles et plus particulièrement avec les groupements sulfhydriles ainsi qu'une fonction epoxide réagissant irréversiblement avec les cystéines nucléophiles. Lorsque l'un ou l'autre de ces groupements est absent l'inhibition en cellule est perdue (Fonrose et al. 2007). Si l'ensemble des informations obtenues aujourd'hui est insuffisante pour affirmer qu'il s'agit d'une cystéine peptidase, il est cependant manifeste que la TCP n'est pas une métalloprotéase.

2.2.2.4. Modulateurs de la détyrosination : pierre d'achoppement de la purification de la TCP ?

De manière générale lors de l'établissement d'un protocole de purification, les différentes étapes sont validées par le taux de purification et dans le cas d'une enzyme celui-ci est généralement estimé par mesure de l'activité de celle-ci (celui de la TCP est le taux de détyrosination). La difficulté de la purification de la TCP est principalement liée aux éléments copurifiés lors des étapes d'enrichissement qui influencent les mesures d'activité et faussent l'estimation de la quantité d'enzyme lors du test. Le taux de détyrosination observé n'est alors pas un bon révélateur de la quantité absolue de TCP présente dans l'extrait ce qui rend l'établissement des étapes de purifications biochimiques de la TCP particulièrement difficile. De très nombreux modulateurs de l'activité de la TCP ont été décrits. Pour la plupart, il s'agit de modulateurs non spécifiques découverts lors d'étapes de purifications. Ces modulateurs agissent de manière indirecte en agissant sur l'état de polymérisation des microtubules ou directement en interagissant avec les microtubules et faussent ainsi l'appréciation de la quantité d'enzyme dans la fraction testée. Il s'agit alors :

- d'éléments modifiant l'état de polymérisation des microtubules. Tout d'abord, la préférence de la TCP pour les microtubules résulte en une activité augmentée en conditions favorisant la polymérisation de la tubuline. C'est le cas lors de l'ajout de GTP (Hallak et al. 1977) ainsi qu'en présence des polyamines spermine, spermidine et putescine dont on connait aujourd'hui la propriété de stimulation de polymérisation (Barra and Argaraña 1982). Au contraire, les conditions favorisant la dépolymérisation comme une forte force ionique ou la présence de colchicine, inhibe la détyrosination. Les premiers tests de détyrosination étaient réalisés sur de la tubuline libre. On comprend alors que lors de la purification de la TCP, la co-purification aspécifique d'éléments modulant la polymérisation aura un impact critique sur l'activité TCP lors des tests *in vitro*.

- d'éléments interagissant de manière aspécifique avec les microtubules ou la TCP. Les polyanions, les ARNs, et les protéoglycanes, très négativement chargés ont été identifiés comme des éléments diminuant fortement et de manière non-spécifique l'activité de la TCP *in vitro*. (Argaraña, et al. 1981; Modesti et al. 1984). D'un autre côté, les polycations tels que la Myelin Basic Protein (MBP), la polylysine ou la protamine ont également un impact négatif sur la détyrosination. Ces polycations s'associeraient de manière aspécifique à la tubuline chargée négativement à sa surface ce qui créerait une gêne stérique pour l'association de la TCP aux microtubules ou générer l'agrégation de la tubuline tel que c'est le cas pour la MPB (Modesti et al. 1986).

- d'éléments interagissant spécifiquement avec les microtubules. La fructose-bisphosphate aldolase, par exemple, a été identifiée comme régulatrice négative de l'activité (N. M. Modesti et al. 1984). Les enzymes de la glycolyse sont connues pour interagir avec les microtubules et de manière surprenante, l'interaction de celles-ci avec le polymère est dépendante de la présence de la queue C-terminale de l'alpha-tubuline (Vértessy et al. 1997; Volker and Knull 1997). Il est donc probable que la GAPDH et autres enzymes de la glycolyse en interagissant avec ces queues C-terminales de la tubuline modifient les résultats des tests de détyrosination *in vitro* si elles se trouvaient copurifiées.

3. Les impacts du cycle de détyrosination/tyrosination

3.1. Impacts physiologiques

Malgré le fait que l'on connaisse le cycle de détyrosination/tyrosination depuis presque quarante ans et que l'identité de la Tubuline Tyrosine Ligase eût été révélée en 1993 (Ersfeld et al., 1993), très peu d'informations concernant les impacts physiologiques de ces modifications au niveau de l'organisme ou du tissu ont été décrits. Les implications connues des dérégulations du cycle concernent le cancer et la contraction musculaire. Ces impacts physiologiques ainsi que le phénotype de la souris invalidée pour la TTL sont abordés dans les prochains paragraphes.

3.1.1. Dérégulation en cellules cancéreuses

L'une des premières observations révélant l'importance physiologique du cycle de détyrosination/tyrosination a été faite lors de l'isolation de clones de cellules 3T3 ayant, par

mutation spontanée, perdu la TTL. Greffées dans une souris « nude », animal immunodéficient qui présente l'avantage de n'engendrer aucun rejet, ces cellules déficientes en TTL génèrent des sarcomes. Lorsque ces cellules stablement retransfectées avec la TTL sont injectées dans ces souris « nude », on observe de nouveau la perte systématique de cette protéine lors des développements de sarcomes. La suppression de la TTL et l'accumulation subséquente de tubuline détyrosinée ont été révélées dans différents types de tumeurs telles que les cancers du sein (**Figure 12**, Mialhe et al. 2001), dans les neuroblastomes (Kato et al. 2004), ou encore dans le cancer de la prostate (Soucek et al. 2006). L'accumulation de tubuline détyrosinée serait un marqueur d'agressivité tumorale et le reflet d'un mauvais pronostic vital. Ces résultats suggèrent ainsi un processus de sélection strict supprimant l'activité de la TTL lors de la croissance tumorale.



Figure 12 : L'accumulation de tubuline détyrosinée est associée à un mauvais pronostic dans les cancers du sein. Immuno-histochimies réalisées sur des tissus de sein marqués pour la tubuline détyrosinée (marron) ou pour les noyaux (bleu). A, tissu sain puis B, C ,D, tissu respectivement de Grade I, II ou III. Les grades évaluent l'agressivité de la tumeur, le stade III étant le plus agressif et de ce fait ayant le plus mauvais pronostic (Adaptée de Mialhe et al. 2001).

D'autre part, Whipple et collaborateurs montreront que la transition épithéliomésenchymateuse, première étape rendant les cellules invasives et menant à la formation de métastases, s'accompagne de l'augmentation de tubuline détyrosinée par la perte d'expression de la TTL. Les microtubules détyrosinés participeraient, via la coorganisation des filaments intermédiaires, à l'élaboration de microtentacles. Les microtentacles, décrits la première fois en 2008 par Whipple et collaborateurs (Whipple et al., 2008) sont des protrusions membranaires sont caractéristiques des cellules métastasiques provenant de tumeurs du sein. Ils constituent des sortes de « bras » qui facilitent le réattachement des cellules tumorales circulantes à un nouveau tissu. Lorsque la quantité de tubuline détyrosinée est diminuée, la proportion de ces microtentacles est également diminuée ce qui réduit le ré-attachement des cellules tumorales et donc leur potentiel métastasique (Whipple et al. 2010; Whipple et al. 2013; Whipple, Cheung, and Martin, 2007). L'inhibition de l'activité de détyrosination est ainsi proposée comme une opportunité thérapeutique permettant de réduire le potentiel métastasique des cancers du sein.

3.1.2. La souris KO TTL, révélation du rôle vital de cette enzyme

Afin d'investiguer l'importance du cycle de détyrosination/tyrosination *in vivo*, la souris déficiente en TTL a été générée (Erck et al. 2005). On observe chez ces souris une large majorité de tubuline alpha sous forme détyrosinée, seule une petite quantité provenant de la néosynthèse de la tubuline se retrouve sous forme tyrosinée uniquement dans les cellules se divisant.

Les conséquences de cette importante diminution de tubuline tyrosinée sont dramatiques puisque les souriceaux meurent quelques heures après leur naissance. Ils ne présentent aucune malformation morphologique externe mais on observe néanmoins une anomalie de connectivité cérébrale et de l'organisation des couches du cortex. La mort des souris est très certainement due aux défauts de formation de la boucle thalamo-corticale. En effet, cette boucle a pour principale fonction le relais et l'intégration des afférences sensitives et sensorielles du thalamus vers le cortex et des efférences motrices du cortex vers le thalamus. L'établissement des connections entre les projections thalamo-corticales et cortico-thalamiques est requis pour générer la différenciation cytoarchitecturale du cortex et l'hypoplasie de cette boucle chez l'embryon est généralement létale (voir revue López-Bendito and Molnár 2003; Vue et al. 2013). Au niveau cellulaire, les fibroblastes présentent des défauts architecturaux et de positionnement du fuseau mitotique (Peris et al. 2006). D'autre part, les neurones déficients en TTL mis en culture exhibent des anomalies morphogénétiques telles qu'une pousse neuritique erratique et accélérée et une différentiation axonale prématurée (Erck et al. 2005). Nous détaillerons dans la partie « impacts moléculaires de la détyrosination » l'ensemble des mécanismes moléculaires pouvant sous-tendre ces phénotypes cellulaires.

3.1.3. Dans le cœur et la contraction musculaire

Dans les myocytes cardiaques, les microtubules jouent un rôle prépondérant dans la fréquence de contraction et donnent une résistance mécanique interne à la fibre. Les microtubules des fibres musculaires sont particulièrement enrichis en tubuline détyrosinée, les autres modifications post-traductionnelles étant peu présentes (voir revue Robison and Prosser 2017). La détyrosination permettrait l'ancrage des microtubules au niveau des disques-Z, qui délimitent les sarcomères, par son association avec une protéine des filaments intermédiaires, la desmine. En effet, l'ablation de tubuline détyrosinée ou celle de la desmine entraine des baisses notables de la rigidité musculaire et la suppression simultanée des deux protéines n'aggrave pas ce phénotype (**Figure 13**). De plus, une augmentation artificielle de la détyrosination par la diminution de l'expression de la TTL dans des myocytes murins provoque un défaut de leur rétrécissement couplé à une augmentation de sa rigidité.

D'un autre côté, Robinson et collaborateurs mettrons en évidence que les patients atteints

de cardiomyopathie dilatée ou hypertrophique montrent une quantité de tubuline détyrosinée significativement supérieure aux patients contrôles. Chez ces patients souffrant de cardiomyopathies, la quantité de tubuline détyrosinée corrèle avec le déclin de la fonction systolique (insuffisance cardiaque). Enfin, chez les souris, la réduction de tubuline détyrosinée des cellules musculaires dystrophiques par traitement au parthénolide, le seul inhibiteur cellulaire de la détyrosination connu à ce jour, restore la signalisation mécanique démontrant ainsi encore une fois l'importance de la régulation de la quantité de tubuline détyrosinée pour une activité contractile normale. (Kerr et al. 2015; Robison et al. 2016).



Figure 13 : La détyrosination permet l'ancrage des microtubules dans les disques-Z des fibres musculaires qui participent leur résistance lors de la contraction. (a) Lorsqu'un cardiomyocyte se contracte, les microtubules compressés se courbent. **(b)** Cela est dû au fait que les microtubules (MT, verts) sont ancrés au niveau des Z-disques (gris) par une protéine d'ancrage, la desmine (fushia). Lorsque la détyrosination est diminuée, l'ancrage des microtubules est ainsi moins important ce qui entraîne une réduction anormale de la longueur du sarcomère lors de la contraction musculaire (Adapté de Robison et al. 2016).

Depuis la découverte du cycle de détyrosination/tyrosination, l'étude de ces modifications fut principalement tournée vers le système nerveux dans lequel la tubuline détyrosinée est extrêmement enrichie. L'ensemble de ces travaux souligne l'importance de ces modifications dans un autre tissu et dans certaines maladies cardiaques ce qui ouvre de nouvelles perspectives d'études pour la compréhension de l'importance physiologique du cycle.

Au travers de ces impacts on observe que l'accumulation excessive de tubuline détyrosinée dans les cancers, dans les neurones ou encore dans les fibres musculaires est fortement associée à des phénotypes pathologiques. Ces données soulignent l'importance de la régulation précise du cycle de détyrosination/tyrosination et par conséquent celle des enzymes responsables. Dans la prochaine partie, nous allons nous intéresser aux fonctions cellulaires qu'impliquent ces modifications.

3.2. Implications cellulaires

3.2.1. Répartition et particularité des microtubules détyrosinés

Les premières études d'immunofluorescence utilisant des anticorps spécifiques de la tubuline tyrosinée ou de la tubuline détyrosinée ont révélé des populations de microtubules distinctes mais superposées dans différents types cellulaires en culture (Gundersen et al. 1984; Geuens et al. 1986). Des études d'ultrastructure révéleront que les microtubules sont en fait constitués des ces deux formes de tubulines de manière plus ou moins enrichie (**Figure 14**, Geuens et al. 1986). On considère alors que les microtubules dit tyrosinés sont constitués majoritairement mais pas exclusivement de tubuline tyrosinée. Il en est de même pour les microtubules détyrosinés.



Figure 14 : Composition des microtubules cellulaires en tubuline tyrosinée et détyrosinée. Microscopie électronique sur microtubules de cellules PtK2 double marqués avec des particules de 5 nm révélant la tubuline tyrosinée et de 8 nm révélant la tubuline détyrosinée. (Adapté de Geuens et al. 1986).

A l'inverse des microtubules tyrosinés qui sont dynamiques, les microtubules detyrosinés se montrent extrêmement stables (Kreis 1987; Bré et al. 1987; Schulze et al. 1987; Gundersen et al. 1987; Khawaja et al. 1988). Dans des fibroblastes, les microtubules détyrosinés ne polymérisent presque plus mais deviennent compétents lorsqu'ils sont fragmentés, c'est-à-dire que l'extrémité « plus » nouvellement générée peut de nouveau polymériser (Infante, Stein, Zhai, Borisy, and Gundersen, 2000; Kreis, 1987). Ils sont également résistants à la dépolymérisation par le bout « plus » induite par la présence de nocodazole -qui s'associe au dimère et diminue la concentration critique- ainsi que par la dilution. A contrario, ces microtubules sont sensibles à la fragmentation par le froid de la même manière que les microtubules tyrosinés (Khawaja et al. 1988). De ces observations émanera alors l'hypothèse de l'existence d'une « coiffe» qui protègerait l'extrémité et en figerait la dynamique. Ce microtubule stabilisé se verrait alors substrat de la détyrosination (Khawaja et al. 1988; Infante et al. 2000).

La détyrosination est une modification ubiquitaire très régulée spatialement et temporellement. Elle se localise de manière générale dans les populations de microtubules particulièrement stables comme dans les centrioles, les cils primaires, et les microtubules neuronaux (Kreis 1987, voir **Figure 15**) et intervient dans différents processus physiologiques qui seront exposés dans la suite de cette partie.



Figure 15: Enrichissement de la détyrosination dans certaines sous populations microtubulaires. Les microtubules enrichis en tubuline détyrosinée sont dessinés en bleu et indiqués par une ligne en pointillés. On retrouve la détyrosination dans les centrosomes, certains microtubules cytoplasmiques, les microtubules kinétochoriens du fuseau mitotique, dans le corps intermédiaire, les flagelles et les cils ainsi que sur les microtubules neuronaux (Adapté de Janke and Bulinski 2001).

La présence de la tubuline détyrosinée dans ces structures localisées sous-tend fortement que celle-ci possède des fonctions cellulaires spécifiques. Nous aborderons dans les prochaines parties l'importance de la détyrosination pour la physiologie cellulaire avant de décrire ses impacts moléculaires.

3.2.2. L'organisation intracellulaire

3.2.2.1. Ancrage de l'appareil de Golgi et support du noyau ?

Dans les cellules en interphase, les microtubules enrichis en tubuline détyrosinée sont généralement plus rares, d'apparence sinueuse, organisés près du noyau et de l'appareil de Golgi (Burgess et al. 1997; Skoufias et al. 1990; Thyberg and Moskalewski, 1993, **Figure 16**). Dès les années 1980, l'importance des microtubules dans l'organisation et le maintien structural de l'appareil de Golgi a été démontrée par l'utilisation de la colcémide, qui en dépolymérisant les microtubules entraîne une relocalisation disparate des vésicules provenant de l'appareil de golgi fragmenté (Wehland et al. 1983). Des études montreront que l'appareil de Golgi s'associe préférentiellement sur des microtubules stables et que son organisation spatiotemporelle suit fidèlement la répartition des microtubules détyrosinés, notamment lors de traitement des cellules au taxol, un composé qui stabilise les microtubules (Burgess et al. 1991; Letourneau and Wire, 1995; Skoufias et al. 1990).



Figure 16 : Dans un fibroblaste les microtubules détyrosinés sont courbés et enrichis près du noyau. Immunofluorescence sur fibroblaste primaire issu d'embryon de souris (MEF) marqué pour la tubuline tyrosinée (gauche, sur superposition en rouge), détyrosinée (milieu, sur superposition en vert) et le noyau (bleu) (acquisitions personnelles).

Afin de déterminer la pertinence de l'aspect bouclé des microtubules détyrosinés observé en

culture 2D, Prescott et collaborateur observèrent l'organisation en 3D du réseau de microtubules stables des cellules du tissu épithélial intact de grenouille. De manière intéressante, ils démontrèrent que ces microtubules sont effectivement ondulés mais également que ceux-ci forment alors une large structure en forme de panier émanant du centrosome et enrobant le noyau. Cette organisation dont le rôle fonctionnel reposerait sur des propriétés mécaniques protectrices est également retrouvée autour des noyaux des neurones sensitifs (Letourneau and Wire, 1995; Prescott et al, 1991).

Malgré l'énorme intérêt que ces questions posent sur la structuration tridimensionnelle des microtubules détyrosinés (et stables) et sur leur importance dans l'organisation intracellulaire, les avancées sont encore malheureusement très peu nombreuses.

3.2.2.2. Organisation des filaments intermédiaires

Après dépolymérisation du réseau microtubulaire par traitement au nocodazole, Gurland et Gundersen observèrent une rétractation des filaments intermédiaires en direction du noyau (Gurland and Gundersen 1995). Ils montrèrent que la détyrosination anormale des microtubules de cellules fibroblastiques par traitement avec du taxol entraîne la réorganisation des filaments intermédiaires. De plus, l'injection en cellule d'anticorps anti-tubuline détyrosinée (et qui vont donc s'associer fortement à celle-ci) entraînent la rétractation des filaments de vimentine. Cette rétractation est également générée par l'injection de tubuline détyrosinée non compétente à la polymérisation (Kreitzer et al. 1999). L'ensemble de ces résultats présuppose fortement un amarrage des filaments intermédiaires sur les microtubules détyrosinés (**Figure 17**, Gurland and Gundersen 1995). L'interaction ne serait cependant pas directe car une kinésine pourrait agir en tant que pont moléculaire entre les deux types de filaments. En effet, la kinésine cosédimente avec les filaments intermédiaires mais également avec les microtubules détyrosinés. De plus, l'injection d'anticorps anti-kinésine entraîne la rétractation des filaments intermédiaires (Gyoeva and Gelfand, 1991; Kreitzer et al. 1999; Liao and Gundersen, 1998).



Figure 17: Co-alignement des filaments intermédiaires avec les microtubules détyrosinés au front de migration de cellule de 3T3 observé par Immunofluorescence. Immunomarquage de la vimentine (a) de la tubuline détyrosinée (b) et de la tubuline tyrosinée (c) (Adapté de Gurland and Gundersen 1995)

A l'exception du muscle où l'association des microtubules détyrosinés avec une protéine des filaments intermédiaires, la desmine, a été démontrée comme cruciale pour la résistance de la contraction de la fibre musculaire et malgré l'intérêt de la question biologique peu de travaux sur la co-organisation des ces éléments du cytosquelette ont été poursuivis.

3.2.3. Le transport intracellulaire

La détyrosination des microtubules intervient dans le transport intracellulaire par l'affinité que lui démontrent les kinésines-1. Cette association préférentielle, que nous décrirons dans la partie concernant les impacts moléculaires (voir paragraphe 3.3.3), a une importance particulière dans le transport directionnel ciblé impliqué lors de la polarisation ou de la migration cellulaire.

3.2.4. La division cellulaire

Les proportions de tubuline tyrosinée et détyrosinée ne varient pas au cours de la division cellulaire. De manière générale, la tubuline tyrosinée est abondante et le marquage se superpose à celui de la tubuline alpha alors que la présence de tubuline détyrosinée est beaucoup plus restreinte. On la trouve sur les fibres kinétochoriennes, est enrichie dans la zone intermédiaire et le corps intermédiaire lors de la télophase et la cytocinèse mais est indétectable sur les microtubules astraux (Gundersen et al. 1984; Gundersen and Bulinski 1986).

Les premiers éléments fonctionnels montrant l'importance de la ségrégation de ces espèces de tubulines dans le fuseau mitotique viendront de l'étude de la division des cellules issues des souris déficientes en TTL (MEFs enrichies en tubuline détyrosinée). Ces fibroblastes possèdent un défaut de polarisation, des anomalies morphologiques et établissent un positionnement anormal du fuseau mitotique (**Figure 18**, Peris et al. 2006).



Figure 18: Défaut d'orientation du fuseau mitotique des cellules MEFs TTL KO sur micro-pattern de fibronectine. A gauche, les cellules issues de souris sauvages (WT) orientent leurs fuseaux mitotiques selon le modèle sur lequel elles adhèrent alors que les cellules déficientes en TTL (TTL KO), à droite, montrent une orientation aléatoire du fuseau mitotique. (a/d) Immunofluorescence de la tubuline tyrosinée et détyrosinée (Glu-tubulin), (b/e) Exemple représentatif de l'orientation du fuseau et (c/f) et quantification des angles. (Adapté de Peris et al. 2006)

De plus, la diminution du taux de tubuline détyrosinée, par l'usage de parthénolide inhibant la TCP ou par la surexpression de la TTL, génère un défaut d'alignement des chromosomes à la plaque équatoriale (lors de la congression). Les chromosomes des pôles proximaux ne migrent pas à la plaque et restent donc aux pôles. Dans le cas contraire d'une augmentation de la détyrosination par traitement avec des ARNs interférants dirigés contre la TTL, les chromosomes sont transportés de manière désordonnée et aléatoire dans différentes directions (**Figure 19**, Barisic et al. 2015).



Figure 19: La perturbation du taux de détyrosination lors de la mitose génère des défauts de congression des chromosomes. La diminution de tubuline détyrosinée (parthénolide) contraint les chromosomes polaires aux pôles cellulaires alors que l'augmentation de tubuline détyrosinée (TTL RNAi) entraîne leurs transports désordonnés et aléatoires. Les kinétochores sont marqués par CENP-A en vert et les microtubules par la tubuline-mCherry en rouge. (Adapté de Barisic et al. 2016)

En d'autres termes, l'altération des taux de tubuline tyrosinée et détyrosinée non seulement génère un problème d'orientation du fuseau mitotique mais perturbe également la congression chromosomale c'est-à-dire l'alignement des chromosomes sur la plaque équatoriale durant la métaphase. Les acteurs moléculaires identifiés dans ces mécanismes seront présentés dans la partie concernant les impacts moléculaires (voir paragraphe 3.3).

3.2.5. La différentiation/morphogénèse cellulaire

La morphogénèse cellulaire ainsi que l'établissement de la polarité chez les Eucaryotes supérieurs sont des processus dépendant des microtubules. Depuis la découverte du cycle de détyrosination/tyrosination, de nombreuses corrélations entre changements morphologiques et taux de détyrosination ont été décrites dans différents types cellulaires. Dès 1987, des modifications distinctes des activités de la TTL et de la TCP avait été observées dans le cerveau et les cellules du muscle squelettique et les pics d'activités semblaient être synchronisés avec la génération des asymétries cellulaires (Deanin 1977; Rodriguez and Borisy 1978; Gundersen and Bulinski 1986; Gundersen and Khawaja 1989; Chang et al. 2002, pour revue voir Bulinski and Gundersen 1991). De manière générale, les cellules en prolifération possèdent très peu de microtubules détyrosinés mais lorsque la différentiation est déclenchée, une augmentation du nombre de microtubules détyrosinés s'observe avant même que des modifications morphologiques aient lieu. C'est le cas pour les cellules musculaires, les neurones ou encore les cellules épithéliales (Wehland and Weber 1987; Gundersen

and Khawaja 1989; Quinones et al. 2011; Zink et al. 2012; Witte et al. 2008; Konishi and Setou 2009). Les microtubules détyrosinés des cellules qui se différencient, contrairement à ceux observés dans les cellules interphasiques, ne sont pas sinueux mais rectilignes et souvent organisés dans le sens de la polarisation. La détyrosination peut être un signal permanent tel que dans les neurones ou les fibres musculaires qui présenteront au cours de leur vie une quantité importante de microtubules modifiés, ou temporaire tel que dans les cellules épithéliales dans lesquelles le signal de détyrosination disparait lorsque la polarité apico-basale est mise en place (Quinones et al. 2011).

L'hypothèse du rôle de la détyrosination lors de la polarisation cellulaire réside principalement dans l'aiguillage de certains moteurs moléculaires dans le maillage complexe de microtubules permettant alors un transport directionnel, ciblé et efficace de cargaisons spécifiques et nécessaires à la polarisation.

3.2.6. La motilité

Dans les certaines cellules telles que les fibroblastes les microtubules détyrosinés semblent avoir un rôle important lors du processus de la migration. Les stimuli extracellulaires, et notamment les acides lysophosphatidiques ou LPA, entraînent l'activation de la GTPase Rho présente à la membrane. Celle-ci activera alors mDia1 qui formera une plateforme pour l'interaction d'APC (Adenomatous Polyposis Coli) et d'EB1. Localisé au bout « plus » des microtubules et capturé au cortex, ce complexe permet la stabilisation des microtubules qui favorise l'apparition de détyrosination (Palazzo et al. 2001; Wen et al. 2004; Bartolini et al. 2008; Dunn et al. 2008).

Comme lors de la polarisation cellulaire, le modèle de Dunn et collaborateurs (schématisé sur la **Figure 20**) propose que ces microtubules détyrosinés soient des voies spécialisées pour le transport de vésicules. En effet, comme nous le verrons dans le paragraphe suivant (paragraphe 3.3), les kinésines conventionnelles s'associent préférentiellement avec les microtubules détyrosinés. La détyrosination permettrait alors le transport directionnel de membranes et de cargaisons spécifiques à la migration.



Figure 20: Modèle du rôle physiologique des microtubules détyrosinés proposé par Dunn et collaborateur. Microtubules dynamiques (tyrosinés, rouge) et stables (détyrosinés, vert).

3.3. Impacts moléculaires de la détyrosination

3.3.1. Caractéristiques intrinsèques des espèces

3.3.1.1. Vitesse de polymérisation in vitro

Lors de la découverte du cycle, la première question fonctionnelle concernant les espèces tyrosinée et détyrosinée concerna leur capacité intrinsèque à polymériser, dépolymériser et former des filaments stables. Plusieurs éléments de réponses furent apportés par différentes équipes (Arce et al. 1978; Kumar and Flavin 1982) mais c'est avec la purification séparée des deux espèces par l'équipe de Didier Job que la question fut résolue (Paturle, Wehland, Margolis, and Job, 1989). Les microtubules constitués entièrement de tubuline tyrosinée ou de tubuline détyrosinée ne révèlent alors aucune différence de dynamique. Ces résultats suggèrent que la détyrosination seule ne modifie pas la dynamique intrinsèque des microtubules.

3.3.1.2. Stabilisation et détyrosination : l'œuf ou la poule ?

La corrélation entre détyrosination et stabilité pose également la question de leur causalité qui est longtemps restée en suspend. Est-ce la détyrosination qui génère la stabilité du microtubule ou est-ce la stabilité qui entraîne la détyrosination des microtubules ? Les éléments précoces répondant à cette question se basèrent sur l'étude de la dynamique des microtubules détyrosinés de manière artificielle et non spécifique. Cette détyrosination est générée en traitant des cellules perméabilisées avec la Carboxypeptidase A ou en leur injectant un anticorps bloquant l'activité de la TTL. Ces microtubules détyrosinés ne démontreront pas de modification significative de la résistance à la dépolymérisation et possèdent une dynamique similaire aux microtubules tyrosinés (Khawaja et al. 1988; Webster et al. 1990). Associées aux résultats obtenus *in vitro* sur les espèces tyrosinée et détyrosinée purifiées ne montrant pas de différence, ces expériences semblent révéler que la détyrosination *per se* ne modifie pas la dynamique des microtubules *in vitro*.

Puisque la détyrosination ne semble pas modifier la dynamique des microtubules, une autre hypothèse serait qu'elle agisse comme marqueur des microtubules stabilisés pour certains partenaires protéiques. On dénombre en effet aujourd'hui quatre partenaires spécifiquement et directement impactés par l'état de tyrosination des microtubules.

3.3.2. Cap-Gly +TIPs protéines

Les domaines CAP-Gly (pour cytoskeleton-associated protein-glycine-rich), sont des modules protéiques de 80 acides-aminés très conservés chez les Eucaryotes. Une des fonctions principales de ces domaines est leur liaison spécifique aux séquences C-terminales EEY/F présentes sur la tubuline ainsi que sur certaines +TIPs telles que EB1. Les protéines à CAP-Gly sont incapables de colocaliser ou de cosédimenter avec les microtubules détyrosinés (Badin-Larçon et al. 2004; Peris et al. 2006; Vaughan et al. 1999), et une relocalisation anormale de ces protéines est observée lorsque le taux de tyrosination est perturbé (Erck et al, 2005).

Parmi les protéines à CAP-Gly étudiées dans le cadre de la détyrosination on retrouve notamment Clip170, impliquée dans la capture des microtubules mitotiques au cortex cellulaire (Lu and Johnston, 2013). Dans les cellules déficientes en TTL les défauts de tyrosination génèrent une altération de l'interaction entre CLIP170 et les microtubules et entrainent des anomalies de l'orientation du fuseau mitotique (Peris et al. 2006). La seconde protéine à CAP-Gly qui montre une association préférentielle avec les microtubules est p150Glued, la grande sous unité du complexe de transport rétrograde appelée dynactine (Peris et al. 2006). Les interactions de CLIP170 et p150Glued avec les microtubules sont impliquées dans l'efficacité du processus d'initiation du transport rétrograde dans les neurones (voir paragraphe 4.3.1, McKenney et al. 2016).

3.3.3. Kinésine-13

La tyrosine des microtubules est également requise pour leur dépolymérisation par les kinésines dépolymérisantes de la famille des kinésines-13, MCAK et son homologue neuronal KIF2A (Peris et al. 2009). La détyrosination réduit l'affinité du domaine moteur de ces kinésines pour les microtubules diminuant alors le taux de dépolymérisation *in vitro* et en cellules des microtubules détyrosinés d'environ 2 à 3 fois par rapport aux microtubules tyrosinés (Peris et al. 2009; Sirajuddin et al. 2014).

La régulation de la dépolymérisation des microtubules par MCAK est particulièrement

importante lors de la mitose et des dérégulations de la tyrosination ou de l'activité de MCAK sont fortement liées à la transformation des cellules (Ritter et al. 2016).

On observe ici que même si les microtubules détyrosinés ne confèrent pas d'eux même une stabilité aux microtubules (voir paragraphe 3.3.1) ils y contribuent *in vivo*. En effet dans les cellules, les microtubules stabilisés seront détyrosinés. Ils seront par conséquent moins sensibles aux moteurs dépolymérisants ce qui consolide alors leur stabilité. Il s'agit d'une boucle renforçant la stabilité des microtubules.

3.3.4. Kinésine-1

Contrairement aux protéines à CAP-Gly et aux kinésines-13 qui nécessitent la tyrosine Cterminale, les kinésines-1 s'associent de manière préférentielle avec les microtubules détyrosinés. En effet, la tyrosination diminue l'affinité d'association des kinésines-1 avec les microtubules, la constante de dissociation étant de 81 nM sur microtubules tyrosinés contre 29 nM sur microtubules détyrosinés (Liao et al. 1998). *In vitro*, sur microtubules purifiés détyrosinés la processivité (longueur moyenne parcourue) et la vélocité des kinésines-1 sont largement diminuées (Dunn et al. 2008; Sirajuddin et al. 2014) traduisant une affinité plus importante des domaines moteurs pour ces microtubules. La composante moléculaire responsable de la répulsion par la tyrosine se situe sur une boucle du domaine moteur de la kinésine (boucle-8-beta5, Konishi and Setou 2009).

Comme évoqué précédemment, cette affinité préférentielle est impliquée dans le transport directionnel par les kinésines-1, ce mécanisme tenant une place particulière lors de la migration et de la différentiation cellulaires.

3.3.5. CENP-E/Kinésine-7

CENP-E, pour Centromere-Associated-Protein E, est une kinésine-7 naviguant sur les kinétochores requise pour la congression chromosomale. Celle-ci possède une affinité accrue pour la détyrosination lui permettant de maintenir son association aux microtubules dans les cas particuliers de fortes contraintes mécaniques (Barisic et al. 2015). La modification du taux de détyrosination, extrêmement régulé lors de la mitose, altère les trajectoires de CENP-E et par conséquent le déplacement de ces cargaisons, les chromosomes (voir paragraphe 3.2.4).

3.3.6. Vue d'ensemble

Partenaires	Préférence pour tubuline	Impacts physiologiques	
Protéine à CAP-Gly (CLIP-150, p150Glued)	Tyrosinée	Dialogue entre microtubules et cortex Initiation du transport retrograde	
Kinésine-13 (MCAK, KIF2A)	Tyrosinée	Maintien de la dynamique microtubulaire	
Kinésine-1	Détyrosinée	Transport directionnel	
CENP-E/Kinésine-7	Détyrosinée	Congression des chromosomes polaires	

Tableau2:RécapitulationdesMAPssensiblesaustatutdedétyrosination/tyrosination de la tubuline et l'impact physiologique de ces affinités.

L'élément central de cette régulation est donc la présence de la tyrosine qui est favorable à l'activité des kinésines-13 et à l'association des protéines à CAP-Gly et qui repousse les kinésines-1 ainsi que CENP-E (voir **tableau 2**). Il a été récemment décrit que la kinésine-2 KIF3C pourrait également posséder une affinité préférentielle pour la tubuline détyrosinée (voir paragraphe 4.3.3.). Enfin, certains résultats négatifs semblent montrer que MAP6, MAP4, ou encore la dynéine ne distinguent pas quant à elles le statut de tyrosination des microtubules et s'associent indifféremment avec les microtubules tyrosinés et détyrosinés (Paturle et al. 1989; Chapin and Bulinski 1994; Sirajuddin et al. 2014). L'importance de ces affinités différentielles prend un sens physiologique particulièrement crucial dans les cellules riches en tubuline détyrosinée comme le neurone. C'est ce que nous allons aborder dans le chapitre suivant.

4. Un cas particulier : le neurone

Les microtubules neuronaux sont l'un des principaux composants des neurones et constituent une structure critique pour la stabilité de la morphologie neuronale. Ils servent de rails sur de longues distances pour le transport intracellulaire, pourvoient des propriétés mécaniques rigides ou dynamiques et peuvent participer localement à la signalisation cellulaire. La majorité des microtubules neuronaux sont particulièrement stables donc très enrichis en modifications posttraductionnelles telles que la polyglutamylation, l'acétylation et la détyrosination. Dans cette partie, après avoir décrit l'organisation générale des microtubules et la répartition des tubulines tyrosinées et détyrosinées au sein du neurone, nous aborderons les différents éléments sous-tendant le rôle fondamental du cycle de détyrosination/tyrosination dans la physiologie neuronale.

4.1. Organisation générale du cytosquelette microtubulaire neuronal

Les neurones possèdent une morphologie extrêmement polarisée comprenant des compartiments structuralement et fonctionnellement définis, les dendrites et l'axone, qui émanent du corps cellulaire. De manière générale les dendrites sont courtes, branchées et reçoivent les informations afférentes alors que l'axone plus fin et plus long est responsable de la transmission du signal électrique aux neurones efférents. Lors de l'élongation des neurites, il se forme une extension transitoire appelée cône de croissance qui perçoit les signaux extracellulaires et oriente la pousse neuritique (**Figure 21**). Il s'agit d'une structure extrêmement labile principalement constituée d'actine et de microtubules dynamiques. A l'exception du cône de croissance, la majorité des microtubules neuronaux présentent une extrême stabilité et on estime leur temps de demi-vie à plusieurs heures contre quelques minutes pour les microtubules dynamiques (pour revue voir Conde and Cáceres 2009).

La plupart des microtubules neuronaux sont non-centrosomaux, c'est-à-dire non ancrés à un centre organisateur des microtubules et peuvent observer des orientations différentes. L'organisation des microtubules dans les dendrites et dans l'axone présente certaines différences. Alors que l'axone possède des microtubules parallèles ayant les bouts « plus » exclusivement orientés vers la périphérie, les dendrites comprennent des microtubules à orientation non-homogène avec une majorité de bout « moins » vers l'extérieur. De plus, les MAPs se répartissent différemment, c'est le cas par exemple de la MAP2 qui est enrichie dans les dendrites ou de Tau et CRMP2 qui sont principalement axonales. En plus des modifications post-traductionnelles, ces différences génèrent une véritable variabilité cytosquelettique des extensions neuronales (pour revue générale voir Kapitein and Hoogenraad 2011).



Figure 21: Organisation des microtubules dans un neurone. Alors que les dendrites montrent des microtubules à orientations non-homogènes, les microtubules de l'axone sont organisés avec leur extrémité « plus » orientée du côté distal. Au bout des neurites en croissance on retrouve le cône de croissance, une structure labile qui sonde l'environnement et oriente la pousse neuritique. Majoritairement constitué d'actine, le cône de croissance est également envahi par les microtubules dynamiques qui émanent du faisceau axonal. (Adapté de Namba et al. 2015)

4.2. Répartition des microtubules tyrosinés et détyrosinés

Alors que les microtubules axonaux, particulièrement stables, sont extrêmement enrichis en tubuline détyrosinée, les microtubules labiles présents dans les cônes de croissance et les parties distales des neurites sont majoritairement tyrosinés. Cette variation de distribution de cette modification révèle une importance fonctionnelle de la dynamique des microtubules neuronaux. En effet, alors que les microtubules des prolongements cellulaires doivent être stables afin de soutenir l'architecture neuronale et l'efficacité du transport intracellulaire, les microtubules entrant dans le cône de croissance doivent être dynamiques pour permettre une réorganisation et/ou une stabilisation rapide du cytosquelette en réponse aux signaux de guidage.

4.3. Implication de ces modifications dans la physiologie

4.3.1. L'établissement de la polarisation et son maintien

Durant les premières étapes du développement neuronal, l'initiation de la formation de l'axone est un évènement crucial dans la rupture de symétrie et l'établissement de la polarisation de la cellule. Les microtubules sont un déterminant majeur de l'initiation axonale qui se caractérise par une formation de faisceaux de microtubules parallèles particulièrement stables et exposant leur bout « plus » vers le cône de croissance (**Figure 21**). L'importance des microtubules et de leur stabilisation dans l'établissement de la polarisation neuronale (**Figure 22**) a été démontrée récemment par plusieurs expériences. Tout d'abord, la déstabilisation pharmacologique légère des microtubules d'un neurone en stade II entraîne la rétractation des neurites mineurs alors que le neurite principal ou futur axone n'est pas affecté (Witte and Bradke, 2008). Ainsi, contrairement aux neurites mineurs, le neurite majeur est composé des microtubules dont la stabilité est accrue et cette stabilisation est cruciale pour l'axonogénèse (pour revue voir Neukirchen and Bradke 2011 ou Conde et Cáceres 2009). En effet, la stabilisation des microtubules d'un neurite mineur par utilisation d'analogue photoactivable du taxol stimule sa maturation en un axone supplémentaire (Witte et al. 2008) et l'addition de faibles doses de taxol dans le milieu de culture des neurones induit la formation de multiples axones (Gomis-Rüth et al. 2008; Hammond et al. 2010).



Figure 22: Les microtubules sont des acteurs majeurs de la spécification axonale qui requiert le transport polarisé de cargaisons axonales. Lors de la spécification axonale, un neurite dont les signaux extracellulaires stimulent la croissance verra ses microtubules se stabiliser. Sur ces microtubules stables et modifiés s'accumuleront des kinésines qui permettront le transport polarisé de cargaisons axonales nécessaires à cette spécification (Adapté de Witte and Bradke 2008).

L'un des mécanismes sous-jacent de l'axogenèse dépendrait en partie de la détyrosination via l'affinité que démontre la kinésine-1 pour ces microtubules. En effet, juste avant le début de la polarisation neuronale on observe une accumulation préférentielle de la kinésine-1 sur le segment initial du neurite principal. Cette accumulation est considérée aujourd'hui comme le marqueur le plus précoce définissant le futur axone (Hammond et al. 2010; Jacobson et al. 2006; Nakata and Hirokawa, 2003). Ce segment montre un ratio de tubuline tyrosinée/détyrosinée inférieur à celui de l'ensemble des microtubules somatiques et est également enrichi en tubuline acétylée (Konishi and Setou 2009). Hammond et al ont démontré que l'acétylation n'est cependant à elle seule ni nécessaire ni suffisante pour recruter sélectivement la kinésine-1 (Hammond et al. 2010). De manière cohérente, la perte sélective de la tyrosination dans les neurones entraîne la redistribution de la kinésine-1 vers les dendrites (Konishi and Setou 2009) ainsi que la formation de multiples axones (Christian Erck, Peris, Andrieux, Meissirel, Gruber, Vernet, Schweitzer, et al. 2005). De plus, l'utilisation de taxol, qui génère la détyrosination homogène des microtubules neuronaux, entraîne également la relocalisation de la kinésine-1 vers les dendrites (Kapitein et al. 2010). L'ensemble de ces résultats supportent fortement l'hypothèse que la tubuline tyrosinée est un signal répulsif pour la kinésine-1, et qui restreint donc sa localisation somatodendritique. La navigation est alors favorisée dans le neurite primaire et cette restriction permet le transport spécifique et polarisé de cargaisons strictement axonales. Le transport directionnel des ces cargaisons est nécessaire à la spécification axonale (**Figure 22**) et par conséquent à la polarisation neuronale (voir revue Hirokawa and Takemura 2005; Arimura and Kaibuchi 2007).

Le transport polarisé par la kinésine pourrait également avoir un rôle tout au long de la vie du neurone. Le knock-down de la kinésine-1 après polarisation des neurones induit une réduction du nombre de neurones polarisés et augmente celui des neurites présentant la MAP Tau-1, généralement axonale. Ces résultats suggèrent que la kinésine-1, et par extension des résultats précédents la tubuline détyrosinée, pourraient être nécessaires au maintien de la polarisation neuronale (Konishi and Setou 2009). Cette modification étant effectivement enrichie dans l'axone, il serait donc d'un intérêt justifié d'étudier l'impact direct du cycle de détyrosination/tyrosination dans le maintien de la polarisation neuronale.

4.3.2. L'initiation du transport rétrograde

Le complexe dynéine-dynactine est le moteur majeur responsable du transport rétrograde neuronal. Son accumulation au bout « plus » des microtubules est modulée par les interactions organisées d'EB1, CLIP170 et p150Glued qui fait partie du complexe dynactine (Duellberg et al. 2014). L'état de tyrosination des microtubules intervient directement dans l'interaction de ces deux dernières protéines.

Concernant CLIP170, le mécanisme de recrutement localisé aux bouts « plus » des microtubules dépend d'au moins trois éléments ; la tyrosination des microtubules, d'EB1 et de l'état de phosphorylation de CLIP170 (**Figure 23**, Peris et al. 2006; Bieling et al. 2008; Dixit et al. 2009; Nirschl et al. 2016).



Figure 23: Le recrutement du complexe dynéine-dynactine dans les neurones aux bouts « plus » des microtubules dépend d'EB, de CLIP170 et de la tubuline tyrosinée. La présence d'EB1 aux extrémités dynamiques des microtubules ainsi que la tubuline tyrosinée permettent l'enrichissement de CLIP-170 déphosphorylé. CLIP-170, en présence de tubuline tyrosinée, recrute à son tour p150Glued, sous-unité majoritaire de la dynactine. Une fois associé aux microtubules, le complexe dynéine-dynactine navigue sur les microtubules indépendamment de leur état de tyrosination (Adapté de Nirschl et al. 2016).

La déphosphorylation des dimères de CLIP170 leur font adopter une conformation ouverte ce qui permet l'interaction de leurs domaines CAP-Gly avec les motifs –EEY de la tubuline tyrosinée et d'EB1. La tyrosine de la tubuline a une importance cruciale dans la localisation neuronale de CLIP-170. En effet, normalement présente aux extrémités neuronales CLIP-170 se relocalise au niveau du soma des neurones invalidés pour la TTL (Erck et al. 2005).

La protéine p150Glued, qui est également une protéine à domaine CAP-Gly, est la principale protéine constituante du complexe dynactine. Le recrutement de cette dernière est dépendant de la localisation de CLIP170 mais également de la tyrosine C-terminale de la tubuline (**Figure 23**). En effet, l'interaction *in vitro* de p150Glued avec les microtubules est abolie par la détyrosination (McKenney et al. 2016; Peris et al. 2006). La capacité de p150Glued à se localiser sur les microtubules tyrosinés nécessite uniquement son domaine CAP-Gly et serait par ailleurs le facteur majeur des complexes dynéine-dynactine à percevoir la tyrosine des microtubules (Nirschl et al. 2016). Une fois recrutés sur les microtubules, les complexes dynéine-dynactine se déplacent et ce indifféremment de l'état de tyrosination des microtubules (McKenney et al. 2016; Nirschl et al. 2016).

La tyrosine C-terminale participe donc à l'initiation du transport via le recrutement de CLIP170 et de p150Glued. Elle n'impacte cependant pas la motilité du complexe dynéine-dynactine (McKenney et al. 2016; Nirschl et al. 2016). Pourtant, la quantité de tubuline tyrosinée nécessaire au transport optimum semble ne pas excéder 50% de la tubuline (McKenney et al. 2016) et la diminution partielle de la tyrosination (par knock down de la TTL) n'impacte pas la proportion de vésicules rétro-transportées dans des neurones de ganglions rachidiens (Song et al, 2015). Ainsi, afin d'apprécier véritablement l'importance physiologique de la tyrosination dans l'efficacité du transport rétrograde il serait nécessaire de l'analyser dans les neurones de souris invalidés pour la TTL ne présentant plus de tubuline tyrosinée.

4.3.3. Pousse axonale et régénérescence nerveuse

Les microtubules adoptent une organisation particulière dans le cône de croissance. Alors qu'ils forment un réseau très dense et parallèle dans le prolongement axonal, ils se dissocient, se dispersent et explorent le cône de croissance (voir Figure 21). Les neurones invalidés pour la TTL présentent in vivo des cônes de croissance élargis et dont l'organisation des microtubules est perturbée (Marcos et al. 2009). Les axones des neurones déficients en TTL sont toujours capables de s'orienter vers les chimioattractants mais émettent des branches surnuméraires. En effet, l'accumulation anormale de tubuline détyrosinée de ces neurones déficients en TTL induit des défauts de dépolymérisation des microtubules. Cela passe par l'inhibition de l'activité de KIF2A, homologue neuronal de la kinésine-13 MCAK, qui nécessite la tyrosine C-terminale pour dépolymériser les microtubules (Peris et al. 2009). De manière intéressante, l'émission de branches axonales collatérales surnuméraires est également un phénotype caractéristique des neurones de la souris invalidée pour KIF2A (Homma et al. 2003). La délétion de KIF2A est létale chez la souris démontrant l'importance de cette protéine et donc de la régulation de son activité dans les neurones. L'analyse de l'impact qu'a la perte de tyrosination dans les neurones déficients en KIF2A pourrait alors nous permettre d'apprécier la part d'importance que ce mécanisme possède dans le phénotype anormal de ces neurones.

De plus, un membre de la famille des kinésine-2, KIF3C, semble également montrer *in vitro* une affinité plus importante pour les microtubules tyrosinés. En effet, les microtubules tyrosinés participent à l'enrichissement des moteurs KIF3C dans le cône de croissance où ils colocalisent avec les bouts « plus ». Cette kinésine-2 est exclusivement exprimée dans le système nerveux durant la différenciation et après une blessure. Même si l'activité de KIF3C n'est pas encore clairement établie, elle possède un rôle crucial dans la régulation de la pousse et de la régénérescence axonale, sa déplétion entraînant une forte diminution de la dynamique des microtubules générant des défauts dans ces deux processus (Gumy et al. 2013).

La diminution du taux de détyrosination par utilisation de parthénolide de manière locale ou systémique chez la souris accélère le processus de régénération nerveuse (Gobrecht et al. 2016a). Au contraire, l'utilisation de taxol contrebalance l'effet positif du parthénolide. Ces résultats suggèrent que l'impact du parthénolide passe par une diminution du taux de détyrosination dans les extrémités axonales, qui via l'augmentation de la susceptibilité aux kinésines dépolymérisantes augmente la dynamique des microtubules. Ainsi, à travers l'impact que la tyrosine exerce sur les activités de KIF2A

et KIF3C, sa présence sur les microtubules dynamiques des cônes de croissance est essentielle au maintien de leur état dynamique requis pour l'établissement correct de réseaux neuronaux ou la régénérescence d'axones blessés.

De plus, comme nous l'avons vu dans la partie précédente, l'initiation du transport rétrograde est modulée par l'état de tyrosination des microtubules. L'efficacité du transport rétrograde est cruciale pour la physiologie des neurones et est particulièrement impliquée dans leur survie et la régénérescence des axones (Rishal and Fainzilber 2014). La blessure de neurones de ganglions rachidiens de souris conduit à une élévation de l'activité TTL au niveau de la lésion. L'augmentation subséquente de tubuline tyrosinée localisée génère un recrutement robuste de CLIP170 et p150Glued au niveau des extrémités lésées et facilite alors l'initiation du transport rétrograde des signaux de blessures vers le soma (Song et al. 2015). La baisse de l'expression de la TTL et donc la diminution générale de la tyrosination dans ce modèle réduit de manière critique la capacité régénérative de 20% dans les 60h après blessure. La modulation du cycle en faveur de la tyrosination apparaît alors comme une stratégie clinique adaptée pour le traitement des lésions nerveuses.

Partenaires	Préférence pour tubuline	Fonctions	Implication dans la physiologique neuronale
CLIP-150, 150pGlued (Protéines à CAP-Gly)	Tyrosinée	Initiation du transport retrograde	
KIF2A (Kinésine-13)	Tyrosinée	Maintien de la dynamique microtubulaire dans le cône de croissance	Pousse axonale Régénération nerveuse
KIF3C (Kinésine-2)			
Kinésine-1	Détyrosinée	Transport directionnel	Spécification axonal Maintien de la polarisation (?)

4.3.4. Vue d'ensemble

Tableau 3: Récapitulatif des partenaires sensibles à la tyrosination et implication de ces modifications dans la physiologie neuronale.

Tout au long de ce chapitre consacré au cycle de détyrosination/tyrosination, nous avons vu que ces modifications, qui reposent sur l'ajout ou le clivage d'une tyrosine sur le C-terminus de la tubuline alpha, révèlent une implication étonnamment critique dans la régulation physiologique de processus telles que la mitose ou la différentiation de nombreux types cellulaires. Aujourd'hui, de plus en plus de données soulignent l'importance de la régulation fine de ce cycle dans des processus pathologiques graves comme le cancer et la neurodégénérescence et poussent fortement à l'élucidation des mécanismes moléculaires impliqués. De manière générale, les dérégulations observées dans ces processus pathologiques penchent en faveur de l'accumulation de tubuline détyrosinée. Aujourd'hui, la compréhension du cycle de détyrosination/tyrosination est en partie ralentie par le fait que nous ne connaissons pas le premier acteur de ce cycle, la Tubuline CarboxyPeptidase. Ainsi, afin de progresser dans la compréhension de la physiopathologie du cycle, il est alors indispensable de révéler l'identité de cette enzyme. Cela a été l'objectif principal de ma thèse dont les résultats sont présentés dans la partie article n°1.

Chapitre III : Les modifications consécutives à la détyrosination

1. La tubuline alpha delta-2

1.1. La découverte de la tubuline non-tyrosinable, la NTT

L'étude de la détyrosination/retyrosination et notamment les tests initiaux permettant de déterminer les taux de tubulines tyrosinées et détyrosinées ont conduit à la découverte d'une forme ne pouvant pas être tyrosinée (Raybin and Flavin 1977; Arce et al. 1978; Barra et al. 1980). La tubuline de cerveau traitée ou non avec la CarboxyPeptidase A (enzyme clivant de manière non-spécifique les tyrosines C-terminales) était incubée avec de la TTL et de la tyrosine radioactive. Alors que la fraction non-incubée avec la CPA donne la quantité initiale de tubuline détyrosinée, la différence de radioactivité entre les fractions traitées ou non avec la CPA donne quant à elle la quantité de tubuline tyrosinée initiale (**Figure 24**). Ils observèrent alors qu'une proportion représentant jusqu'à 50% de tubuline de cerveau n'était pas capable d'incorporer de la tyrosine même après traitement avec la CPA. Cette fraction fut par conséquent nommée Non-Tyrosinatable Tubulin ou NTT. Deux principales hypothèses expliquant l'incapacité de cette tubuline à entrer dans le cycle furent émises. Premièrement, la TTL se fixant à la jointure du dimère et donc en partie sur la tubuline beta, certains isotypes pourraient interdire la tyrosination en empêchant l'association avec l'enzyme. La deuxième hypothèse proposait quant à elle que cette tubuline possède une différence sur sa séquence C-terminale ne permettant pas à la TTL d'additionner une tyrosine.



Figure 24 : Estimation des quantités des tubulines tyrosinée et détyrosinée cérébrales.

La NTT fut isolée par chromatographie d'affinité pour la première fois en 1989. La tubuline de cerveau purifiée est tyrosinée puis passée sur une colonne d'anticorps YL1/2, un anticorps monoclonal dirigé contre la tubuline tyrosinée. La tubuline non retenue et donc non tyrosinée, est encore une fois incubée avec la TTL et repassée sur cette même colonne. La tubuline non retenue constitue la NTT (Paturle et al. 1989). De manière intéressante, des Western-Blots de cette NTT testée pour la tubuline tyrosinée ou détyrosinée démontreront que ces anticorps ne reconnaissent pas cette tubuline. Ces résultats appuient la deuxième hypothèse concernant la NTT qui semble différer par sa séquence C-terminale. La séquence de la tubuline constituant la forme majeure de cette NTT sera alors déterminée par spectrométrie de masse et test Elisa compétitif (Paturle-Lafanechère et al. 1991). Cette tubuline alpha correspond à une forme débarrassée de ces deux derniers acides aminés C-terminaux, elle sera nommée tubuline delta-2.

1.2. Les enzymes impliquées dans la génération de la tubuline delta-2

Les enzymes responsables de la formation de la tubuline delta-2, les CCPs pour Cytosoliques CarboxyPeptidases, ont été mises en évidence par le laboratoire (Rogowski et al. 2010). L'activité protéasique des six CCPs a été démontrée sur les chaines latérales de glutamates des tubulines alpha et beta, les définissant comme les enzymes responsables de la déglutamylation (voir **tableau 1**). A l'exception de la CCP5, toutes les CCPs sont également capables de générer de la tubuline delta-2 en clivant un glutamate de l'alpha-tubuline détyrosinée (Rogowski et al. 2010; Tort et al. 2014; Aillaud et al. 2016, voir **Figure 25**).



Figure 25 : Les CCPs 1,2,3,4 et 6 déglutamylent l'alpha tubuline détyrosinée ce qui génère la tubuline delta-2. (Adapté de Janke et al., 2012)

1.3. Caractéristiques physiologiques et implications cellulaires de la tubuline alpha delta-2

1.3.1. Localisation de la tubuline alpha delta-2

La tubuline delta-2 est une forme particulièrement abondante dans le cerveau où elle peut représenter jusqu'à 35 % des formes de tubuline alpha. Par ailleurs, il s'agit du seul tissu dans lequelle elle est observable physiologiquement (Paturle-Lafanechère et al. 1994). Plus précisément, ce variant s'accumule dans les neurones différenciés et se répartit de manière homogène entre dendrites et axones (Paturle-Lafanechère et al. 1994; Redeker et al, 1996). Elle est exclue des microtubules cytoplasmiques des cellules gliales et des cellules non différenciées, et on la retrouve enrichie uniquement dans les cils et les centrioles des cellules qui se divisent (Paturle-Lafanechère et al. 1994). La tubuline alpha delta-2 est également présente dans l'axonème des spermatozoïdes d'oursins (Redekeret al. 1996; Multigner et al. 1996).

La répartition physiologique de la tubuline delta-2 suggère très fortement que celle-ci soit générée sur des microtubules particulièrement stables et persistants. Ce postulat de marqueur d'hyper stabilité des microtubules delta-2 est également appuyé par l'observation de l'apparition de tubuline delta-2 sur le réseau microtubulaire de cellules qui se divisent par traitement à forte dose de taxol (Paturle-Lafanechère et al. 1994).

En accord avec la présence préférentielle de tubuline delta-2 dans les cellules différenciées, celle-ci s'accumule aux cours du développement cérébral. Sa quantité très faible lors de l'embryogénèse augmente rapidement après la naissance (Aillaud et al. 2016; Redeker et al. 1996). Enfin, mise à part le fait que la tubuline delta-2 semble s'accumuler lors des processus de neurodégénérescence (Vu et al. 2017), nous ne savons encore que très peu de choses concernant le rôle physiologique de celle-ci. Une hypothèse de l'importance de la tubuline delta-2 est alors fondée sur l'incapacité de celle-ci à être de nouveau tyrosinée. Il s'agirait d'une réaction « irréversible » bloquant la tubuline dans un état « non-tyrosiné ».

1.3.2. Implication physiologique moléculaire

Aujourd'hui, aucun travail portant sur la détermination d'un rôle potentiel ou d'un mécanisme moléculaire spécifique dépendant de cette tubuline delta-2 n'a été proposé. Paturle et collaborateurs montreront que la NTT, constituée majoritairement de la forme delta-2, possède *in vitro* les mêmes propriétés dynamiques que les tubulines tyrosinée et détyrosinée excluant toute spécificité fonctionnelle intrinsèque (Paturle et al. 1989).

1.3.3. La tubuline alpha delta-2, une modification irréversible ?

Comme nous l'avons vu plus tôt dans ce manuscrit, les travaux sur la TTL expliquent l'impossibilité de tyrosination de la tubuline delta-2 (Voir paragraphe 2.1.2.). Aujourd'hui cette forme

est injustement décrite comme irréversible suite à l'interprétation de deux observations. Tout d'abord, la réexpression de la TTL dans des cellules TTL^{-/-} restaure le taux de tubuline tyrosinée et détyrosinée alors que celui de tubuline delta-2 persiste. Le deuxième élément vient de l'observation de la persistance de ce variant dans le cône de croissance, compartiment dans lequel la tubuline détyrosinée est rapidement reconvertie en tubuline tyrosinée (Lafanechère and Job, 2000). Ces deux éléments suggèrent que la suppression du glutamate C-terminal permet à la tubuline de sortir du cycle détyrosination/tyrosination et la bloque dans un état non tyrosinable. Il n'exclut cependant pas une reglutamylation de la tubuline delta-2 en tubuline détyrosinée.

2. Et pourquoi pas une tubuline delta-3?

Les CCPs étant des déglutamylases capables de couper séquentiellement plusieurs glutamates il est alors imaginable que ces enzymes puisse aussi couper l'antépénultième glutamate de la tubuline delta-2 (de séquence -GEEEGE). Cela générerait un variant auquel il manquerait ces trois derniers acides aminés, la tubuline delta-3 (de séquence -GEEEG). Berezniuk et al. montreront alors que la CCP5 est effectivement capable *in vitro* de déglutamyler la tubuline delta-2 formant de la tubuline delta-3 (Berezniuk et al. 2013). Nos travaux présentés dans la partie « article n°2 » et débutés avant la publication de ces résultats, montrent que non seulement la tubuline delta-3 peut être générée par plusieurs des membres de la famille des CCPs, mais également que ce variant existe de manière physiologique.

Objectifs de thèse

Mon travail de thèse s'inscrit dans un objectif global de l'étude de la régulation fonctionnelle des microtubules par les modifications post-traductionnelles.

Le laboratoire s'intéresse depuis toujours au cycle de détyrosination/tyrosination de l'alpha tubuline et aux mécanismes moléculaires permettant d'expliquer l'importance de ces modifications *in vivo*. L'étude du cycle est aujourd'hui très limitée par le fait que nous ne connaissons pas l'identité de la première enzyme qui agit sur l'alpha tubuline : la Tubuline CarboxyPeptidase ou TCP. L'objectif premier de mon travail de thèse a été la mise au point d'un protocole de purification de cette enzyme dans le but de l'identifier par spectrométrie de masse. Grâce au soutien de l'équipe et la réalisation d'une quatrième année de doctorat, j'ai pu valider l'identité de la protéine candidate et entreprendre la caractérisation des enzymes découvertes. Ces travaux sont décrits dans la partie « article n°1 », dont l'article est actuellement soumis et dans lequel j'ai réalisé la majorité des expériences de biochimie.

En parallèle de ce travail, j'ai participé à la mise en évidence de l'existence physiologique de deux nouvelles modifications post-traductionnelles des tubulines alpha et beta. Ces travaux ont été publiés en 2016 et sont présentés dans la partie « article n° 2 ».

Chaque partie 'article' débute par une introduction, suivie d'une partie présentant les principaux résultats puis d'une discussion et d'une conclusion. Enfin, le manuscrit sera clôturé par une conclusion générale replaçant l'apport des ces travaux dans le contexte des connaissances actuelles sur les microtubules.

RESULTATS ET DISCUSSIONS

Article n°1: « Vasohibins/SVBP are Tubulin CarboxyPeptidases (TCP) that regulate neuron differentiation »

1. Introduction

Les microtubules sont des éléments du cytosquelette essentiels qui participent à des processus cellulaires cruciaux tels que la division, la motilité et la différentiation. Le cycle de détyrosination/tyrosination de l'alpha tubuline fait partie des modifications post-traductionnelles qui en contribuant à la régulation fonctionnelle des microtubules permettent la diversité de leurs rôles. Le cycle de détyrosination/tyrosination consiste en la coupure de la tyrosine C-terminale de la tubuline alpha par une Tubuline CarboxyPeptidase (TCP) qui peut être ré-ajoutée par la Tubuline Tyrosine Ligase (TTL). Ces modifications n'ont lieu que sur la tubuline et ont un rôle crucial in vivo. En effet, les souris déficientes en TTL présentent des défauts d'organisation du cerveau et meurent peu après leur naissance (Erck et al. 2005). L'état de tyrosination est particulièrement crucial pour la physiologie neuronale et sa dérégulation génère des défauts majeurs de l'extension neuritique, de la spécification et de la pousse axonale (Erck et al. 2005; Hammond et al. 2010; Konishi and Setou, 2009; Marcos et al. 2009), du transport antérograde (McKenney et al. 2016) ainsi que de la régénérescence axonale (Gobrecht et al. 2016; Song et al. 2015). Le cycle de détyrosination/tyrosination est également impliqué lors de la mitose dans la régulation de l'orientation du fuseau mitotique et l'alignement des chromosomes (Barisic et al. 2015; Peris et al. 2006). L'augmentation anormale du taux de tubuline détyrosinée est par ailleurs associée à l'agressivité tumorale ainsi qu'à un mauvais pronostic vital des patients atteints de cancer (Lafanechère et al. 1998; Mialhe et al. 2001). Enfin, la détyrosination a été récemment impliquée dans le mécanisme de méchanostransduction de cellules musculaires et sa dérégulation est associée à différentes pathologies cardiaques (Kerr et al. 2015; Belmadani et al. 2002; Robison et al. 2016).

Depuis la description de son activité il y a 40 ans (Carlos E. Argaraña et al. 1978), la TCP est restée inconnue demeurant ainsi un chainon manquant d'importance majeure pour la compréhension de la physiopathologie du cycle de détyrosination/tyrosination. L'objectif principal de ma thèse fut donc la mise au point d'un protocole de purification permettant l'identification et la caractérisation de la Tubuline CarboxyPeptidase. Ce travail de thèse, qui s'inscrit à la suite de travaux initiés par Anouk Bosson (ancienne doctorante) et Marie-Jo Moutin, est présenté dans l'article n°1 que nous avons soumis récemment et dont les principaux résultats sont exposés ci-dessous.

2. Résultats

Stratégie de purification et identification d'un candidat « TCP » potentiel, la vasohibine-1

Avec pour objectif l'enrichissement maximal de l'activité TCP, nous avons mis au point à partir
de cerveau de souris, une purification en trois étapes inspirée des travaux d'Argaraña et de Kumar et Flavin (voir **figure S1A de l'article n°1**, Argarana et al. 1980; Kumar and Flavin 1981). La fraction finale se révèle cependant être encore très riche en protéines (fraction IV, **figure 1A**). Ainsi afin d'isoler la protéine portant l'activité catalytique, nous avons ensuite réalisé une étape d'affinité grâce à un inhibiteur irréversible. L'incubation d'une fraction enrichie en activité TCP avec différents inhibiteurs commerciaux révèle que l'enzyme pourrait être une protéase à sérine ou à cystéine (voir **figure S2A**). De plus, l'activité de la fraction IV montre une sensibilité 100 fois plus importante pour un inhibiteur présentant une phénylalanine (TPCK) comparé à son homologue présentant une leucine (TLCK), ce qui est cohérent avec une activité de coupure spécifique d'acides aminés aromatiques (voir **figure S1B**).

En se basant sur ces résultats, des inhibiteurs contenant un groupement epoxide ont été synthétisés. Il s'agit d'une fonction particulièrement intéressante car elle a l'avantage de réagir de manière covalente et très spécifique avec les cystéines catalytiques (nucléophiles). Le parthénolide, un composé utilisé pour l'inhibition de la détyrosination dans les cellules, possède cette fonction epoxide, qui est essentielle à son activité (Fonrose et al. 2007). En se basant sur la séquence de la queue C-terminale de la tubuline, la fonction epoxide a été couplée à un, deux ou trois acides aminés de cette séquence respectivement –Y, -EY ou –EEY (figure S2B). Parmi eux l'inhibiteur epoY (fonction epoxide suivie d'une tyrosine, voir structure figure S1C) se révèle être le plus efficace (figure 1B) et semble inhiber irréversiblement l'activité de détyrosination (figureS2C et 2D). Une fonction alcyne lui a alors été rajoutée afin de rendre cet inhibiteur « cliquable » (alkyne-epoY, figure 1C). Cela signifie, que par réaction de « clic », l'inhibiteur peut être couplé de manière covalente à des étiquettes présentant des fonctions azides, fluorochromes ou billes d'agarose par exemple (schéma figure 1D).

L'analyse en SDS-PAGE du « clic » de la fraction IV inhibée par alkyne-epoY avec un fluorochrome TAMRA révèle un marquage spécifique des quelques bandes protéiques (**figure 1E**). La réaction de « clic » a alors été réalisée avec des billes d'agaroses afin de sédimenter et d'identifier par spectrométrie de masse les protéines cibles de l'inhibiteur (**figure 1D**). Le soin apporté à l'élimination des protéines contaminantes par lavages dénaturants lors des cette étape nous a permis d'obtenir un seul candidat largement enrichi dans l'échantillon positif, la protéine vasohibine-1 (**figure 1F**, séquences peptidiques identifiées **figure S2E**, **table S1**).

Les vasohibines sont capables de détyrosiner et déphénylalaniner la tubuline alpha

La vasohibine-1 et son homologue vasohibine-2 sont principalement décrites comme intervenant dans la régulation de l'angiogénèse (voir en annexe « complément d'information concernant la partie article n°1 »). Cependant de récents travaux de bioinformatique révèlent qu'elles possèdent toutes deux une triade catalytique non-canonique Cys-His-Ser (**figure 1F**) et

qu'elles appartiennent à la famille des protéases TransGlutaminase-Like (Sanchez-Pulido and Ponting 2016). De plus, les vasohibines possèdent un partenaire protéique de forte affinité appelé SVBP (Small Vasohibin Binding Protein) qui agirait comme une chaperonne. Nous avons alors examiné la capacité de détyrosination de ces protéines.

Alors que l'expression des vasohibines seules dans les cellules n'entraîne qu'une faible augmentation de tubuline détyrosinée, leur coexpression avec SVBP génèrent une détyrosination presque complète de l'alpha tubuline qui est soulignée par la perte de tubuline tyrosinée (figure 2A et **2B**). Les complexes Vasohibines/SVBP sont également capables de couper la phénylalanine présente au C-terminus de la tubuline alpha8 (figure 2C). L'activité de ces protéines semble alors spécifique aux acides aminés aromatiques puisque lorsque l'on mute la tyrosine ou la phénylalanine C-terminales en alanine, la génération de tubuline détyrosinée est abolie (figure 1C et S2B). Enfin, lorsque leur cystéine catalytique présumée (Sanchez-pulido and Ponting 2016) est mutée en alanine, la capacité de détyrosination de ces protéines est perdue (deadV1 et deadV2, figure 2A, 2B et S3A). Afin de valider l'activité catalytique intrinsèque de ces protéines, nous avons réalisés une purification partielle des vasohibines surexprimées (figureS4A). Ces purifications montrent que la protéine SVBP copurifie spécifiquement avec les vasohibines et que cette association n'est pas dépendante de l'activité catalytique puisqu'elle copurifie également avec les versions mutées (deadV1 et deadV2, figure S4A). Les tests in vitro sur microtubules purifiés confirment la capacité de détyrosination des vasohibines et permettent d'estimer la vitesse initiale des réactions. Elles sont respectivement de 4,6 et 4,9 pmoles de tyrosine. μ g⁻¹.min⁻¹ pour la vasohibine-1 et pour la vasohibine-2 (**figure 2D**).

Les premières études de la Tubuline CarboxyPeptidase ont souligné l'importance de l'état polymérisé de la tubuline pour son activité (voir paragraphe 2.2.2). En accord avec ces travaux, les complexes vasohibines/SVBP montrent une activité plus efficace sur les microtubules que sur de la tubuline sous forme de dimère libre (**figure 2E, S4B, C** et **D**). De plus, la détyrosination n'étant décrite que sur la tubuline cela suggère que la Tubuline CarboxyPeptidase possède une certaine sélectivité pour son substrat. Afin de vérifier cette spécificité, nous avons testé la capacité des vasohibines purifiées à détyrosiner la protéine EB1. Cette protéine possède les mêmes acides-aminés C-terminaux que la tubuline –EEY mais n'est généralement pas présente sous forme détyrosinée (Bosson et al. 2012; Rovini et al. 2013). De manière surprenante, seule la vasohibine 2 semble capable de détyrosiner la protéine EB1 *in vitro* (**figure 2F**) ce qui souligne une différence biochimique entre les deux homologues.

Les vasohibines sont impliquées dans la différenciation neuronale et le développement cérébral

Afin de confirmer l'activité et rôle physiologiques de ces protéines, nous avons examiné l'impact de la baisse de l'expression des vasohibines et de SVPB dans les neurones où ces modifications sont

particulièrement enrichies. Même si les protéines sont indétectables en Western-blot, l'expression dans les neurones de ces trois protéines est fortement suggérée par la présence de leur transcrit (figure 3A). L'utilisation d'ARN interférents ciblant les vasohibines 1 et 2 (validés en figure S5A) entraîne une diminution de tubuline détyrosinée de presque 50 % (figure 3B) témoignant de leur rôle physiologique de détyrosinase. De manière cohérente avec l'importance du cycle pour la physiologie neuronale (voir chapitre II, paragraphe 4) la diminution de détyrosination s'accompagne de phénotypes anormaux. En effet, les neurones présentent un retard de différentiation révélé par une baisse de la proportion des neurones présentant un axone (figure 3C/D). Les axones de ces neurones sont plus courts, le nombre des neurites primaires et de branchements de ces neurites est augmenté (figure3E). Ces anomalies morphologiques sont également retrouvées lorsque l'on diminue le taux de détyrosination par une baisse de l'expression de SVBP dans les neurones (figure S5B, C et D).

Afin de questionner le rôle des ces vasohibines *in vivo*, nous avons analysé l'effet de la diminution de leur expression lors de la corticogenèse chez la souris. Pour cela nous avons électroporé les plasmides codant pour des ARN interférents dirigés contre les vasohibines dans les progéniteurs neuronaux d'embryon de souris. L'analyse, quatre jours après révèle que la majorité des neurones exprimant l'ARN contrôle ont migré jusqu'à la couche supérieure. En revanche on observe un important retard de migration des neurones exprimant les ARN interférents ciblant les vasohibines (figure 4A et B).

Les vasohibines, en régulant la détyrosination, semblent ainsi avoir des rôles fondamentaux lors de la différentiation neuronale et le développement cortical. Ces résultats sont en accord avec l'observation de défauts neuronaux et de l'organisation des couches corticales de la souris invalidée pour la TTL.

3. Discussion et perspectives

Corrélation des caractéristiques biochimiques de la TCP et de la vasohibine-1

Depuis la découverte du cycle de détyrosination/tyrosination, même si la Tubuline Carboxypeptidase est restée non-identifiée des informations sur ses caractéristiques biochimiques se sont accumulées. Celles-ci corrèlent avec les caractéristiques de la vasohibine-1 que nous avons identifié par spectrométrie de masse. En effet, le point isoélectrique de la TCP qui a été estimé autour de 9 (Weizetfel et al. 1997) correspond à celui de la vasohibine-1 qui est de 9,4. Enfin, il a été suggéré que la TCP soit un complexe de protéines dont la sous-unité catalytique aurait une masse moléculaire d'environ 50 kDa. Cela corrèle avec la vasohibine-1 qui est une protéine de 42 kDa et dont l'activité semble effectivement nécessiter la présence d'un partenaire, la SVBP. Ces corrélations suggèrent que l'activité détyrosinase étudiée depuis 40 ans soit bien celle de la vasohibine-1. De plus, s'il s'avère que l'association entre SVBP et la vasohibine-1 est absolument nécessaire à l'activité enzymatique, il serait alors fort probable que les difficultés de purifications de la TCP proviennent de la perte de partenaire aux cours des différentes étapes.

Spécificité de substrat des vasohibines/SVBP

Dans cet article, nous démontrons que les complexes vasohibines/SVBP sont capables de détyrosiner et déphénylalaniner la tubuline alpha *in vitro*. Leur activité est plus efficace sur les microtubules que sur la tubuline libre. Cette observation peut s'expliquer de deux manières. D'une part, la tubuline n'ayant pas la même conformation lorsqu'elle est libre ou sous forme polymérisée, les complexes TCPs pourraient reconnaitre certaines caractéristiques structurales des microtubules facilitant leur activité. D'autre part, nous pouvons également imaginer que la probabilité de rencontre entre l'enzyme et le substrat est favorisée lorsque la tubuline est polymérisée. Cette dernière hypothèse est appuyée par une étude montrant que la TCP est capable de détyrosiner des fragments de la queue C-terminale de la tubuline alpha suggérant que l'intégrité de la structure du dimère n'est pas requise pour son activité (Weizetfel et al.1989).

Nous avons également montré que seule la vasohibine-2 était capable de détyrosiner EB1 *in vitro* soulignant des différences intrinsèques entre les deux homologues. Dans les cellules et tissus EB1 n'est généralement pas retrouvée sous forme détyrosinée. En effet, en cellules fibroblastiques, EB1 n'est jamais détectée sous forme détyrosinée et même lorsque la TTL est absente (Bosson et al. 2012). On observe EB1 sous forme détyrosinée uniquement dans certaines cellules tumorales ou dans les cellules endothéliales humaines de veines de cordon ombilical (HUVECs, Rovini et al. 2013) dans lesquelles la vasohibine-1 est extrêmement enrichie. Si les vasohibines sont effectivement capables de détyrosiné EB1, ces observations suggèrent que les mécanismes de régulation de la détyrosination et de la spécificité du substrat *in vivo* dépendent d'autres facteurs manifestement absents lors de ces tests.

Afin d'apporter des éléments de réponse clairs, l'obtention de vasohibines purifiées sera nécessaire et permettra de déterminer les caractéristiques enzymatiques telles que la vitesse catalytique mais également de préciser leur spécificité de substrat. Des mutations de la tubuline ou d'EB1 permettraient ainsi de définir les séquences minimales de reconnaissance de substrats. Egalement, des mutants tronqués des vasohibines permettront de révéler la fonctionnalité des domaines de ces protéines et notamment de déterminer, s'ils existent, leur domaine de liaison aux microtubules. Enfin, tel qu'il a été le cas pour la TTL, la cristallisation des vasohibines sera certainement essentielle à la compréhension des mécanismes de spécificité de substrat et notamment de son activité sur la tubuline versus sur les microtubules.

SVBP, plus qu'une chaperonne ?

Nos travaux montrent que la coexpression de SVBP est nécessaire à l'activité des vasohibines et que ces deux protéines copurifient. SVBP semble notamment essentielle à la solubilité des vasohibines (Suzuki et al. 2010). Nos travaux ne permettent cependant pas de discerner le rôle exact de SVBP et il sera important de déterminer si elle est nécessaire à la synthèse et au bon repliement de la vasohibine ayant alors un rôle transitoire de chaperonne ou s'il s'agit d'un activateur de l'enzyme. Encore une fois, l'obtention des protéines purifiées et mutées sera essentielle à la résolution du rôle exact de la protéine SVBP.

Les régulateurs potentiels de l'activité détyrosinase

Il a été montré que l'augmentation globale de la phosphorylation (par traitement aux inhibiteurs de phosphatases) entraîne l'inhibition de la détyrosination ainsi que le détachement de la TCP des microtubules (Sironi et al. 1997; Contin et al. 2003). Il envisageable que l'effet observé passe par une phosphorylation directe de la TCP. En effet, la phosphorylation des MAPs telles que MAP1, MAP2 ou Tau est connue pour diminuer leur capacité à se lier aux microtubules. Cela génère des charges négatives sur ces protéines qui diminuent ainsi leur affinité pour les microtubules eux-mêmes chargés très négativement en surface. De plus, des résultats préliminaires obtenus au laboratoire montre que lorsque l'on traite la fraction IV avec de l'alcaline phosphatase, la détyrosination augmente de plus de 40 %. L'ensemble de ces informations suggèrent que l'activité des vasohibines, et particulièrement leur association avec les microtubules, pourrait être régulée par la phosphorylation/déphosphorylation. Il sera donc intéressant d'analyser la séquence des vasohibines afin d'identifier les potentiels sites de phosphorylation. Aussi, des tests de phosphorylations in vitro des vasohibines purifiées pourront être réalisés avec des phosphates radioactifs permettant de valider cette hypothèse. Enfin, des mutations (phosphomimétique ou non-phosphométique) de sites potentiels de phosphorylation pourront alors être réalisées permettant d'élucider l'impact de ces phosphorylations.

L'activité des vasohibines et ainsi la détyrosination pourraient également être régulées par le calcium. En effet, les analyses bioinformatiques identifient les vasohibines comme des membres de la famille de cystéine protéases, les transglutaminase-like (TG-Like). Le calcium est un régulateur essentiel de l'activité des TG : en s'associant à ces enzymes il entraine un changement de conformation essentiel à leur activation (Ahvazi et al. 2003; Zhang et al. 1998). L'alignement de séquence montre que le glutamate E171, site de liaison du calcium de la TG-Like LapG, est conservé dans les séquences des vasohibines (Sanchez-Pulido and Ponting 2016). Le calcium favorise également l'activité de la TCP *in vitro* (Webster and Oxford 1996). Cet ion est connu pour défavoriser l'état polymérique des microtubules. Sachant que la polymérisation de la tubuline favorise l'activité

de la TCP et que le calcium également, cela suggère que cet ion ai un effet direct sur l'enzyme (Berkowitz and Wolff 1981). L'obtention des vasohibines purifiées permettra de réaliser de nombreux tests d'activité en différentes conditions et en présence ou absence de différents composés et notamment celle du calcium.

Fonctions physiologiques des vasohibines/SVBP dans les neurones

Le cycle de détyrosination/tyrosination joue un rôle particulièrement important dans la physiologie neuronale. La diminution du taux de tyrosination de 40 % observée lors de la baisse de l'expression des vasohibines génère un phénotype neuronal cohérent avec celui des neurones déficients en TTL (Peris et al. 2009). La perturbation des taux de tubuline tyrosinée et détyrosinée altère la pousse neuritique, la longueur axonale ainsi que le nombre de branchement. Lorsque l'on observe des neurones à deux ou trois jours après leur mise en culture, l'augmentation du taux de détyrosination semble entraîner une augmentation de la longueur des neurites (Peris et al. 2009) alors que sa diminution retarde leur pousse. Ces observations suggèrent que la perturbation du cycle de détyrosination/tyrosination altère la vitesse d'extension des neurites.

L'impact de la baisse d'expression des vasohibines, même si elle entraîne une forte modification du taux de tyrosination, pourrait cependant passer par un autre mécanisme impliquant ces protéines. Il serait alors intéressant de réaliser un sauvetage des neurones invalidés pour les vasohibines par l'expression des formes inactives de ces protéines, les dead-V1 et dead-V2. L'impact de l'activité de détyrosination des vasohibines pourra alors être clairement déchiffré.

Régulation parallèle du cycle de détyrosination/tyrosination : la tubuline apha4

Malgré l'efficacité des shARN ciblant les vasohibines, la baisse de la tubuline détyrosinée dans les neurones n'est pas supérieure à 40 %. Même si l'hypothèse de l'existence d'une autre TCP neuronale peut être considérée, la présence du reste de tubuline détyrosinée provient très certainement de l'isoforme de tubuline alpha4, la seule isoforme néosynthétisée sous forme détyrosinée. Même s'il a été montré que cette isoforme peut être tyrosinée par la TTL *in vitro* (Gu et al. 1988), elle existe très majoritairement sous forme native dans le cerveau de rat (Redeker et al. 1998). Dans le cerveau la tubuline alpha4 semble être exclusivement neuronale. Elle représente 15 % de la tubuline de cerveau total et de ce fait constituerait une proportion beaucoup plus importante de la tubuline neuronale. De manière intéressante, la tubuline alpha4 est également enrichie dans les fibres musculaires (lisses, striées et cardiaques, Villasante et al. 1986; Gu et al. 1988) où le cycle de détyrosination/tyrosination joue un rôle particulièrement crucial (Robison et al. 2016; Robison and Prosser 2017). Chez le rat, les activités enzymatiques des TTL et TCP semblent être maximales durant le développement et diminuent progressivement pour atteindre un minimum chez l'adulte (Alonso et

al. 1993; Webster 1997) alors que la proportion de tubuline détyrosinée s'enrichie avec l'âge. L'expression de tubuline alpha4 dans ces cellules différenciées pourrait donc représenter une part importante de la fraction de tubuline détyrosinée qui représente jusqu'à 50 % de la tubuline alpha.

L'isoforme de tubuline alpha4 devrait être considérée comme partie intégrante du cycle, et son étude sera nécessaire à la compréhension de la physiopathologie du cycle de détyrosination/tyrosination. Par exemple, les analyses des expressions et des caractéristiques des variants détyrosinés alpha1A/B et alpha4 permettront de déterminer si ces deux isoformes concourent à la même fonction intracellulaire et sont ainsi interchangeables.

Rôle de la détyrosination dans l'établissement des couches corticales

La baisse de l'expression des vasohibines dans les progéniteurs neuronaux entraîne une perturbation critique de l'établissement des couches corticales. Si cela révèle un rôle crucial de ces protéines durant le développement cérébral, le phénotype peut cependant provenir de différentes étapes. En effet, l'électroporation des plasmides étant réalisée dans des progéniteurs neuronaux, les défauts de migration peuvent provenir de l'altération de la division, de la différentiation, de la polarisation ou encore de la migration neuronale. Afin de mieux comprendre l'implication de vasohibines dans la génération de ces phénotypes, il serait nécessaire de réitérer ces expériences en plaçant les séquences codantes des ARN interférents après des promoteurs spécifiques (tel que Nestin pour les progéniteurs ou NeuroD pour les neurones post-mitotiques). Nous pourrions également d'électroporer et/ou analyser les cortex à différents stades du développement permettant de mieux décortiquer les mécanismes impliquant la bonne régulation du cycle.

Perspectives d'étude du cycle de détyrosination/tyrosination : implication des vasohibines

La découverte des Tubulines CarboxyPeptidases ouvre de nombreuses possibilités concernant les perspectives d'études du cycle de détyrosination/tyrosination. Aussi, l'étude des caractéristiques biochimiques et la cristallisation des vasohibines seront cruciales dans la compréhension des mécanismes intracellulaires de ces enzymes. Il sera également essentiel de clarifier leur profil d'expression spatial et temporel afin de révéler les différences entre ces deux homologues.

L'étude de l'importance de ces protéines *in vivo* passera par l'étude et la caractérisation des souris invalidées pour ces protéines. Les souris invalidées pour les vasohibines 1 et 2 séparément sont viables et ne montrent aucun phénotype pathologique externe (Kimura et al. 2009, et l'observation des souris développées au laboratoire). Cependant, cela s'avère cohérent si l'on imagine que les deux enzymes se compensent. Ainsi l'étude de la souris invalidée pour les deux enzymes sera plus pertinente. Nos résultats révèlent que la prolifération, la différentiation, la polarisation ou la migration des progéniteurs neuronaux peuvent être altérées lorsque les vasohibines sont absentes résultant en un retard critique de l'établissement des couches corticales. L'étude approfondie des cellules de souris déficientes en vasohibines 1 et 2 et particulièrement de leurs neurones permettra de révéler l'implication de ces protéines dans la physiologie neuronales. Étant donné que la souris invalidée pour la TTL présente des défauts majoritairement cérébraux, l'analyse de l'anatomie cérébrale de la souris invalidée pour les vasohibines sera d'un intérêt particulier.

4. Conclusions

Dans cet article, nous révélons l'identité des Tubulines Carboxypeptidases dont l'activité est connue depuis 1977. Cette identification a été rendue possible grâce à la combinaison d'une purification poussée couplée à une étape d'affinité via un inhibiteur synthétisé suivant les caractéristiques biochimiques de l'activité TCP. Nous avons montré que le candidat identifié en spectrométrie de masse la vasohibine-1 ainsi que son homologue la vasohibine-2, possèdent toutes deux une activité de détyrosinase et déphénylalaninase *in vitro* lorsqu'elles sont coexprimées avec leur partenaire la protéine SVBP. Nos travaux révèlent que les vasohibines ont un rôle crucial dans la différentiation neuronale et la diminution de leur expression *in vivo* génère des retards critiques lors de l'établissement des couches corticales. Ces résultats soulignent l'importance physiologique de ces enzymes. La révélation de l'identité des Tubuline CarboxyPeptidases, les complexes vasohibines/SVBP, ouvre de nouvelles perspectives et ces résultats devraient permettre d'améliorer notre compréhension du cycle de détyrosination/tyrosination et de son implication lors de processus physiologiques et pathologiques.



Title:

Vasohibins/SVBP are tubulin carboxypeptidases (TCP) that regulate neuron differentiation

Authors:

Chrystelle Aillaud^{1,2}, Christophe Bosc^{1,2}, Leticia Peris^{1,2}, Anouk Bosson^{1,2}, Pierre Heemeryck^{1,2}, Juliette Van Dijk^{3,4}, Julien Le Friec^{1,2}, Benoit Boulan^{1,2}, Frédérique Vossier^{1,2}, Laura E. Sanman⁵, Salahuddin Syed⁵, Neri Amara⁵, Yohann Couté⁶, Laurence Lafanechère⁷, Eric Denarier^{1,2,8}, Christian Delphin^{1,2}, Sandrine Humbert^{1,2}, Matthew Bogyo⁵, Annie Andrieux^{*1,2,8†}, Krzysztof Rogowski^{*3†}, and Marie-Jo Moutin^{*1,2}.

Affiliations :

¹Univ. Grenoble Alpes, Grenoble Institut des Neurosciences, GIN, F-38000 Grenoble, France ²Inserm, U1216, F-38000 Grenoble, France.

³CNRS UMR9002, Institut de Génétique Humaine, IGH, Univ. Montpellier, 34000 Montpellier, France.

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

⁵Department of Pathology, Stanford University School of Medicine, Stanford, California 94305, USA.

⁶Univ. Grenoble Alpes, CEA, INSERM, BIG-BGE, F-38000 Grenoble, France.

⁷Team Regulation & Pharmacology of the Cytoskeleton, Institute for Advanced Biosciences,

INSERM U 1209, CNRS UMR 5309, Univ. Grenoble Alpes, 38000 Grenoble, France.

⁸CEA, BIG-GPC, F-38000 Grenoble, France.



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

†These authors contributed equally to this work

Abstract:

Reversible detyrosination of α -tubulin is crucial to microtubule dynamics and functions and its defect has been implicated in cancer, brain disorganization and cardiomyopathies. The identification of the tubulin tyrosine carboxypeptidase (TCP) in charge of detyrosination remained however unsuccessful. Here, using chemical proteomics with a potent unique irreversible inhibitor, we found that 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, exhibit robust and specific Tyr/Phe carboxypeptidase activity on microtubules. Knock down of vasohibins or SVBP in cultured neurons results in a marked reduction of tyrosinated α -tubulin levels and onset of severe differentiation defects. Furthermore, knock down of vasohibins disrupts neuronal migration in developing mouse neocortex. These results establish vasohibin/SVBP complexes as TCP enzymes. The impact of the detyrosination enzymes on microtubule functions in health and disease may now be further explored.

One sentence summary:

Vasohibins complexed to SVBP exhibit α -tubulin detyrosination on microtubule which is essential to neuron polarization and brain cortex development.



Main text:

Microtubules are cytoskeletal polymers of α/β tubulin dimers centrally involved in cell division, motility and morphogenesis. In the detyrosination/tyrosination cycle of tubulin, the C-terminal tyrosine of α -tubulin is removed by an elusive peptidase (TCP) and re-added by the tubulin tyrosine ligase (TTL, for review see (1)). This cycle, which is unique to tubulin and mostly conserved among evolution from chordate to mammals, has a vital role *in vivo* (2). Tubulin de/tyrosination of α -tubulin is an important regulatory signal for mitosis (3-5), for neuronal physiology (6-8), and for muscle mechanotransduction (9, 10). Consequently, abnormal tyrosination levels are associated with cell transformation and tumor aggressiveness (11, 12), neuronal disorganization (2), and heart failure and cardiomyopathies (10, 13). Although the detyrosination reaction was first described 40 years ago (14), the identity of TCP remained unknown, and a complete understanding of the cycle is therefore still lacking. Here, we successfully identified vasohibin/SVBP complexes as TCP enzymes and studied the impact of their down-regulation on neuron physiology.

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

To isolate the protein(s) responsible for TCP activity from fraction IV, we reasoned that an irreversible inhibitor could be used as in other chemical proteomic studies (*16*). We first tested the sensitivity of brain TCP to various commercial protease inhibitors. The activity was inhibited by several serine/cysteine protease inhibitors (AEBSF, TLCK, TPCK, E-64,



parthenolide) and by the thiol-reactive compound N-Ethylmaleimide (Figs. S2A and 1B). These results, in agreement with prior studies (*17*), strongly suggested that the catalytic activity of the putative TCP depends on a catalytic cysteine.

Although E-64 only showed modest inhibitory activity (IC₅₀ around 300 µM, Fig. 1B), this natural product is an ideal starting point for inhibitor design because its reactive epoxide electrophile can display a peptide or amino acid mimicking native protein C-terminus. Furthermore, parthenolide, a compound widely used to down-regulate detyrosination levels in cells (4, 6, 9, 10) contains an epoxide function which was shown essential to its cellular effect (17). We thus synthesized three inhibitors, epoY, epoEY and epoEEY, which contain the epoxide coupled to one, two or three amino-acids from the α -tubulin C-terminus (Fig. S2B). We found that epoY was the most potent inhibitor of the TCP activity (IC₅₀ around 500 nM, Fig. 1B). We therefore synthesized an analog of epoY (alkyne-epoY) that could be used for purification of labeled targets using click chemistry to an affinity tag. Alkyne-epoY retained a strong inhibitory potency (Fig. 1B) and irreversibly inhibited the enriched enzyme activity (Fig. S2C, D). We performed probe labeling of fraction IV with alkyne-epoY (or the control epoY) followed by a click reaction to attach an azide-TAMRA red-fluorescent dye (Fig. 1D). Labeling showed specific modification of a small number of proteins around 50 kDa (Fig. 1E). To identify these inhibitor targets, we pretreated Fraction IV with either alkyne-epoY or epoY control, isolated the labeled proteins by click reaction to azide-agarose beads, and analyzed by mass spectrometry the proteins covalently attached to the beads (Fig 1D). The results from three independent experiments identified the protein vasohibin-1 (VASH1) as the most likely TCP candidate (Table S1 and Auxiliary Supplemental Table). Peptides covering the almost full VASH1 sequence were detected only in the alkyne-epoY treated samples (Fig. S2E). Furthermore, recent bioinformatics data show that Vasohibin-1 and its homologue



vasohibin-2 (VASH2) possess a non-canonical Cys-His-Ser catalytic triad and are previously undetected members of the transglutaminase-like cysteine proteases family (*18*) (Fig. 1F).

Vasohibin proteins (41-42 kDa) have been extensively characterized as angiogenesis regulators but are still poorly understood on a molecular level (*19*). Recent studies identified SVBP (Ccdc23) as a high affinity binding partner of vasohibins that has a chaperone-like function (*20*). Consequently, we examined the ability of VASH proteins to detyrosinate α -tubulin in cells in the absence or presence of SVBP. Expression of vasohibins alone in HEK293T cells resulted in a slight increase of detyrosinated tubulin, whereas expression of either protein with SVBP resulted in a substantial increase in detyrosinated tubulin (Fig. 2A). Importantly, mutation of the putative catalytic cysteine on vasohibins (C179A for VASH1, and C158A for VASH2 (*18*)) abolished their capacity to produce detyrosinated tubulin. Similarly, in murine embryonic fibroblasts (MEF), expression of the vasohibins with SVBP resulted in complete detyrosination of endogenous α -tubulin (Fig. 2B and S3A).

Alpha-tubulins are generally encoded with a C-terminal tyrosine preceded by two glutamates. Alpha4-tubulin lacks however the C-terminal tyrosine and α 8-tubulin contains a C-terminal phenylalanine residue. Moreover, phenylalanine can be incorporated in place of tyrosine in tubulin and be a possible cause of neuronal dysfunction (*21*). We therefore tested the substrate specificity of the vasohibins by overexpressing α 1B- and α 8-tubulin together with VASH1 or VASH2 and SVBP in HEK293T cells. Both tubulin isotypes were cleaved by active vasohibins when expressed with SVBP (Figs. 2C and S3B). Vasohibins were however unable to cleave the C-terminal residue when tyrosine was mutated to alanine (Figs. 2C and S3B), confirming the specificity of VASH proteins for C-terminal tyrosine and phenylalanine residues.



To further confirm the catalytic function of vasohibins and the nature of their interactions with SVBP, we overexpressed them in HEK293T cells in the absence or presence of SVBP and purified the resulting complexes using a cobalt resin. SVBP co-purified with both vasohibins as expected from previous affinity measurements, (K_D 30-90 nM (20)), and complex formation was not dependent on catalytic activity (Fig. S4A). Importantly, we found that the two protein complexes efficiently catalyze tubulin detyrosination while complexes containing the catalytic dead versions of the vasohibins were unable to detyrosinate tubulin (Fig. 2D). Both complexes more rapidly cleaved microtubules compared to tubulin dimers (Fig. 2E, S4B), consistent with the reported specificity of brain TCP (*1*, *22*, *23*). Purified VASH1/SVBP complex was not able to cleave the C-terminal tyrosine from EB1 indicating its clear tubulin preference, whereas, intringuingly VASH2/SVBP complex was able to partially detyrosinate EB1 in the same conditions (Fig. 2F). In most cell types, including neuronal-derived, C-terminal tyrosine cleavage was shown restricted to tubulin (*1*, *15*). EB1 can however be detyrosinated in specific endothelial and tumor cells (*24*) and this may be related to their VASH2 contents or defect in a regulatory mechanism.

To confirm the functional significance of vasohibins and their role in α -tubulin detyrosination, we assessed the phenotypic effects of knocking down expression of these proteins in differentiating neurons where the de/tyrosination cycle is highly important for growth cone pathfinding and axon differentiation, i. e. for neuron polarization (2, 7, 8). Although we were unable to detect vasohibins and SVBP by Western-blot in mouse neurons using commercial antibodies, we amplified their transcripts from RNA preparations of cultured hippocampal neurons as well as of adult and embryonic mouse brain tissues (Fig. 3A). We transfected hippocampal neurons with plasmids expressing short hairpin RNAs (shRNAs) targeting either the vasohibins or SVBP, as well as control shRNA (validated in Fig. S5A). Western-blot analysis showed that the levels of detyrosinated α -tubulin were



almost decreased by 50 % when either the two vasohibins or SVPB were down-regulated, demonstrating their significant role in detyrosination of neuronal microtubules (Fig. 3B). The remaining pool of detyrosinated α -tubulin in the knock downs is likely due to the presence of α 4-tubulin, which genetically lacks the C-terminal tyrosine and remains in detyrosinated form in the brain (25). Confocal images of neurons cultured 2 days in vitro (2DIV) confirmed a decrease in the levels of the native detyrosinated α -tubulin upon reduction of vasohibins expression (Fig. 3C). The remaining detyrosinated pools are specifically concentrated in the axon, while α-tubulin in neurites appears highly tyrosinated. A morphometric analysis indicated that vasohibins down-regulation led to a clear delay in axonal differentiation, as shown by a reduced proportion of stage III cells (having an axon) both at 2DIV and 3DIV (Fig. 3D). Tau and ankyrin staining of neurons bearing an axon confirmed normal distribution, with Tau highly expressed in axon shaft at 3DIV and ankyrin in the axon initial segment at 10DIV (Figs. S6 and S7). Interestingly, 2DIV neurons knocked down for vasohibins develop an increased number of neurites and branches with overall reduced axon length (Fig. 3E). A delay of axon differentiation and similar morphological anomalies were observed when down-regulating SVBP (Fig. S5B-D). Thus, contrary to the premature axonal differentiation observed in the absence of the reverse enzyme TTL (2), here we observe a clear delay of axon differentiation when down-regulating vasohibins or SVBP.

We next tested the functional significance of vasohibins *in vivo* in mouse brain and focused on the cerebral cortex where the de/tyrosination cycle is critical for the neocortex layer organization (2). During corticogenesis neuronal migration relies in part on neuron polarization which we showed is highly dependent on vasohibins and SVBP (Fig. 3C, D). We electroporated E14.5 embryos with the plasmids expressing shRNAs targeting the vasohibins as well as control shRNA, and analyzed radial neuronal migration four days later. We used the validated shRNAs that suppressed approximately 50% of detyrosinated α -tubulin pools in



cultured neurons (Fig. 3B). At E18.5, most neurons from control brains have reached the upper layer (bin 1), whereas in the absence of vasohibins a significant fraction of neurons failed to do so (Fig 4A, B). We thus conclude that these enzymes have a crucial role in neuronal migration during brain cortex development.

Overall our results indicate a critical role of the vasohibins and of their associated partner SVBP in neuron and brain, and further support that they are the long sought after tubulin carboxypeptidases.

TCP remained the crucial missing element of the α -tubulin de/tyrosination cycle for 40 years. In the present work, we identify vasohibins as enzymatic proteins that perform the TCP function (Fig. 4C). We show that their interacting partner SBVP is essential for their activity. We reveal the critical involvement of vasohibins and SVBP in neuronal differentiation and brain cortex development, and describe a new inhibitor targeting this family of enzymes that could be used for further functional studies of vasohibins. The failure of prior attempts to identify TCPs most probably resulted from the essential association of vasohibins with SVBP for stability and activity which could likely be lost during standard purification assays. In agreement with TCP functions, vasohibins are widely distributed in eucaryotes, have broad tissue expression, and vasohibin-1 (which is generally more expressed than vasohibin-2) is abundant in brain, heart and kidney (*18*, *26*, *27*) (see also GTEx Portal on https://www.gtexportal.org/home/). Identification of the elusive TCP activity should now provide an understanding, at the molecular level, of the relationship between α -tubulin detyrosination and cellular microtubule stability (*28*, *29*).

Interestingly, vasohibins were shown to be critical for cell and tissue integrity and defects in these proteins were associated with cancers (30), as would be expected for enzymes that regulate microtubule stability through detyrosination. Overall, the discovery of TCPs



provides valuable information to unravel the function(s) of the cycle of de/tyrosination, and

its impact on health and disease.

References and notes:

- 1. H. S. Barra, C. A. Arce, C. E. Argarana, *Molecular neurobiology* **2**, 133 (Summer, 1988).
- 2. C. Erck et al., Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America **102**, 7853 (May 31, 2005).
- 3. A. C. Badin-Larcon *et al.*, *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* **101**, 5577 (Apr 13, 2004).
- 4. M. Barisic et al., Science (New York, N.Y 348, 799 (May 15, 2015).
- 5. L. Peris *et al., The Journal of cell biology* **174**, 839 (Sep 11, 2006).
- 6. P. Gobrecht et al., J Neurosci **36**, 3890 (Apr 6, 2016).
- 7. Y. Konishi, M. Setou, *Nat Neurosci* **12**, 559 (May, 2009).
- 8. S. Marcos et al., PloS one 4, e5405 (2009).
- 9. J. P. Kerr *et al.*, *Nature communications* **6**, 8526 (Oct 08, 2015).
- 10. P. Robison *et al., Science (New York, N.Y* **352**, aaf0659 (Apr 22, 2016).
- 11. L. Lafanechere *et al., Journal of cell science* **111 (Pt 2)**, 171 (Jan, 1998).
- 12. R. A. Whipple *et al., Cancer Res* **70**, 8127 (Oct 15, 2010).
- 13. S. Belmadani, C. Pous, R. Ventura-Clapier, R. Fischmeister, P. F. Mery, *Molecular and cellular biochemistry* **237**, 39 (Aug, 2002).
- 14. M. E. Hallak, J. A. Rodriguez, H. S. Barra, R. Caputto, FEBS Lett 73, 147 (Feb 1, 1977).
- 15. A. Bosson et al., PloS one 7, e33490 (2012).
- 16. M. A. Child *et al.*, *Nat Chem Biol* **9**, 651 (Oct, 2013).
- 17. X. Fonrose et al., Cancer Res 67, 3371 (Apr 1, 2007).
- 18. L. Sanchez-Pulido, C. P. Ponting, *Bioinformatics* **32**, 1441 (May 15, 2016).
- 19. Y. Sato, Journal of biochemistry **153**, 5 (Jan, 2013).
- 20. Y. Suzuki *et al., Journal of cell science* **123**, 3094 (Sep 15, 2010).
- 21. Y. Ditamo, Y. M. Dentesano, S. A. Purro, C. A. Arce, C. G. Bisig, *Scientific reports* **6**, 38140 (Dec 01, 2016).
- 22. G. G. Deanin, S. F. Preston, R. K. Hanson, M. W. Gordon, Eur J Biochem 109, 207 (Aug, 1980).
- 23. N. Kumar, M. Flavin, *The Journal of biological chemistry* **256**, 7678 (Jul 25, 1981).
- 24. A. Rovini *et al., PloS one* **8**, e65694 (2013).
- 25. V. Redeker, Methods Cell Biol 95, 77 (2010).
- 26. S. Nimmagadda *et al., Dev Dyn* **236**, 1358 (May, 2007).
- 27. T. Shibuya et al., Arteriosclerosis, thrombosis, and vascular biology 26, 1051 (May, 2006).
- 28. L. Paturle-Lafanechere et al., Journal of cell science 107 (Pt 6), 1529 (Jun, 1994).
- 29. D. R. Webster, G. G. Gundersen, J. C. Bulinski, G. G. Borisy, *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* **84**, 9040 (Dec, 1987).
- 30. R. Norita et al., Cancer science 108, 419 (Mar, 2017).
- 31. V. K. Khodiyar et al., Genomics 90, 285 (Aug, 2007).
- 32. C. Aillaud *et al.*, *Molecular biology of the cell* **27**, 640 (Feb 15, 2016).
- 33. K. Rogowski *et al., Cell* **143**, 564 (Nov 12, 2010).
- 34. S. Ramirez-Rios et al., Molecular biology of the cell 27, 2924 (Oct 01, 2016).
- 35. C. E. Argarana, H. S. Barra, R. Caputto, *Journal of neurochemistry* **34**, 114 (Jan, 1980).
- 36. J. Milbradt et al., Mol Cell Proteomics 13, 2132 (Aug, 2014).
- 37. J. D. Pedelacq, S. Cabantous, T. Tran, T. C. Terwilliger, G. S. Waldo, *Nat Biotechnol* **24**, 79 (Jan, 2006).



- 38. I. Arganda-Carreras, R. Fernandez-Gonzalez, A. Munoz-Barrutia, C. Ortiz-De-Solorzano, *Microsc Res Tech* **73**, 1019 (Oct, 2010).
- 39. M. Barnat, J. Le Friec, C. Benstaali, S. Humbert, *Neuron* **93**, 99 (Jan 04, 2017).

Acknowledgements:

The authors would like to dedicate this manuscript to Dr Hector Barra, father of the de/tyrosination cycle who passed away on 2nd december 2016. We are grateful to Didier Job who strongly supported initiation of the project and for his constant encouragements. We thank Marjorie Comte, Elodie Martin, Charlotte Corrao, and Céline Paoli for technical assistance. We thank zootechnicians of the Grenoble Institut des Neurosciences for animal care. We thank Michel Steinmetz for providing purified TTL, Anne 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), 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).

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



Supplementary materials:

Materials and Methods

Author contributions

Figs S1 to S7

Table S1

References (34-39)



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 μ g of proteins). We performed an ammonium sulfate precipitation step followed by two successive ion exchange columns stages (Fig. S1). (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, consistent with a high affinity for an aromatic residue. Parthenolide is a cellular detyrosination inhibitor containing an epoxide electrophile. E-64 is a natural product inhibitor of clan CA cysteine protease containing an epoxide electrophile. EpoY, epoEY and epoEEY are designed inhibitors containing the epoxide from E-64 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 +/- SD, n = 3-6). (C) Structure of alkyne-epoY. (D) Schematic representation of the last steps of TCP identification using Cu-catalyzed azide-alkyne cycloaddition (click reaction). (E) Labeling of putative TCP from fraction IV by TAMRA probe 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 α -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 α -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-a1B-tubulin, each VASH and SVBP. Native or mutated versions of α 1B-tubulin, respectively ending with EEF or EEA, were used. Levels of de/tyrosinated tubulin were measured as in (A). Antibody to mCherry demonstrates same amounts of exogenous α -tubulin. (D) Detyrosination activity of purified VASH/SVBP complexes assessed using radiolabeled microtubules (6-8 μ 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. 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 µM) 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 (5µM). 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 *Svbp* transcripts are found in brain tissues and hippocampal neurons. RT-PCR reactions of 45 cycles were performed for all indicated tissues and cells using 50 ng of purified mRNA, except for GAPDH for which only 25 cycles were performed. (B) Western-



blot analysis of the effect of VASH1 and VASH2 (shV1 + shV2) or SVBP (shSVBP) downregulation on levels of detyrosinated tubulin in neurons. Neurons were transfected by electroporation with shRNAs associated to turboGFP (tGFP) cDNA just before plating and analyzed at 2DIV (results from triplicate immunoblots of three independent neuronal cultures). (**C-E**) 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. (**C**) Tyrosinated and detyrosinated α -tubulin levels were imaged at 2DIV using the same antibodies as in Fig. 2. Levels of shRNA were imaged using an anti-tGFP antibody. Note that scale bars are different. (**D**) Stage III neurons (bearing an axon) were counted manually on immunofluorescence images (generated as in C) from 3 to 4 different cultures at 2DIV and 3DIV. (**E**) Morphometric analyses of at least 85 neurons (at 2DIV) using AutoNeuriteJ macro (see Methods for details) on immunofluorescence images generated as in C. *, P<0.05; ***, P<0.0005, ****, P<0.0001 (*t* or Mann-Whitney tests).





Fig. 4. Down-regulation of vasohibins affects radial migration of newborn cortical neurons. (A) Cortical coronal sections of E18.5 embryos electropored at E14.5 with indicated shRNAs. 20 µm. (B) Quantitative analysis showing the distribution of GFP positive neurons across the cortex divided into six equal bins. Data from 5 brains per condition, mean ± SEM. ***p<0.001, ****<0.0001 ns, not significant, (Mann-Whitney test). (\mathbf{C}) Detyrosination/tyrosination cycle and implicated enzymes: a central position of tubulin carboxypeptidase (TCP). α -tubulin is usually neosynthesized with a C-terminal aromatic residue, tyrosine for most genes or phenylalanine for $\alpha 8$ gene (31). α -tubulin can enter into the de/tyrosination cycle when the $\alpha\beta$ -tubulin dimer incorporates a microtubule and becomes a TCP substrate. TCP removes the last aromatic residue generating microtubule bearing detyrosinated α -tubulin (or $\alpha\Delta 1$ -tubulin). Detyrosinated α -tubulin pool can also be fed by the direct neosynthesis from $\alpha 4$ gene coding for an α -tubulin without last aromatic residue. To complete the cycle, the microtubule depolymerizes and liberates detyrosinated dimers which can be re-tyrosinated by tubuline tyrosine ligase (TTL). Whereas TTL enzyme consists of a



single protein, TCP enzymes discovered in the present study comprise a catalytic unit (vasohibin) and an accessory protein (SVBP, small vasohibin-binding protein). Due to a duplication event of an ancestral vasohibin gene, vertebrates possess two TCP catalytic subunits, vasohibin-1 (VASH1) and vasohibin-2 (VASH2). Detyrosinated α -tubulin is the source of other modifications. Penultimate and ante-penultimate glutamate residues can be sequentially processed by the CCP family enzymes to generate $\alpha\Delta 2$ - and $\alpha\Delta 3$ -tubulin, respectively (28, 32, 33).



Supplementary Materials for

Vasohibins/SVBP are tubulin carboxypeptidases (TCP)

that regulate neuron differentiation

Chrystelle Aillaud^{1,2}, Christophe Bosc^{1,2}, Leticia Peris^{1,2}, Anouk Bosson^{1,2}, Pierre Heemeryck^{1,2}, Juliette Van Dijk^{3,4}, Julien Le Friec^{1,2}, Benoit Boulan^{1,2}, Frédérique Vossier^{1,2}, Laura E. Sanman⁵, Salahuddin Syed⁵, Neri Amara⁵, Yohann Couté⁶, Laurence Lafanechère⁷, Eric Denarier^{1,2,8}, Christian Delphin^{1,2}, Sandrine Humbert^{1,2}, Matthew Bogyo⁵, Annie Andrieux^{*1,2,8†}, Krzysztof Rogowski^{*3†}, and Marie-Jo Moutin^{*1,2}.

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

This PDF file includes:

Materials and Methods Author contributions Figs S1 to S7 Table S1 References (34-39)

Other Supplementary Materials for this manuscript includes the following:

Auxiliary information Auxiliary Table

Materials and Methods:

Animals. Male or females mice were used between 2-4 months old. 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 24th 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 and by the ethics committee of GIN number 004 accredited by the French Ministry for of Research.

Preparation of tyrosinated tubulin and microtubule, and EB1. Bovine brain tubulin (12 mg/mL, prepared as in(*34*)) was tyrosinated by incubation for 45 min at 30°C with purified chicken TTL (1 mg/mL, gift from Steinmetz group) and 0.1 mM L-tyrosine or [¹⁴C]-L-tyrosine (0.125 μ Ci/nmole) in 40 mM Pipes at pH 6.7, 60 mM KCl, 2.5 mM ATP, 1 mM DTT, 12.5 mM MgCl₂. Microtubules polymerization was allowed by one-third dilution in 100 mM PIPES at pH 6.7, 1 mM EGTA, 1 mM MgCl₂, 30% glycerol, 1 mM GTP and incubation at 32°C for 45 min, followed by another 45 min incubation with 50 μ M Paclitaxel (Calbiochem). Microtubules were sedimented by 25 min centrifugation at 100,000 *g* and 30°C on 60% glycerol cushions. TTL-containing supernatant was discarded and tyrosinated-microtubules were resuspended in 100 mM PIPES at pH 6.7, 1 mM EGTA, 1 mM MgCl₂, 10% glycerol, 80 μ M paclitaxel and stored at -20°C. To obtain unpolymerized tyrosinated-tubulin, paclitaxel was omitted during the whole procedure. EB1 was prepared as in(*34*).

TCP activity assays. In radioactivity tests using [¹⁴C]-tyrosinated taxol-stabilized microtubule, enzyme activity was measured in 100 mM MES at pH 6.7, 1 mM EGTA and 1 mM MgCl₂ using 2 μ M radiolabeled tubulin, except in Figs. 2D and S2D (as indicated in legend). Reactions were performed for 45 min at 37°C (without or with previous incubation with inhibitors, see legends) and were stopped on ice by addition of 20 μ g/ml bovine serum albumin and 10% perchloric acid and centrifugation. Tyrosine cleaved from microtubules was estimated by measuring radioactivity in the supernatant (a zero time control was subtracted). To compose the table of Fig. S1A, detyrosination activity from equal volumes of the various fractions was measured. In tests with inhibitors, detyrosination activity was tested after a 20 min preincubation with inhibitor (except in Figs. S2C and S2D where varying time of incubation were used as indicated in legend), and results with inhibitors were expressed as percentage of the activity in the control with corresponding solvent. In tests using Western-blots, enzyme activity was assayed with 5 μM substrates (taxol-stabilized microtubule, tubulin or EB1) in 100 mM MES at pH 6.7, 1 mM EGTA and 1 mM MgCl₂ for times indicated in figures. Positive controls were done with carboxypeptidase A (2 ng/mL). Reactions were stopped by addition of Laemmli buffer. A reaction with carboxypeptidase A (CPA), which efficiently cleaves aromatic and aliphatic C-terminal residues, was used as positive control. In tests using VASH/SVBP complexes purified on cobalt resin from HEK293T cells, enzymes concentration were approximated from in-gel Coomassie-blue staining of purified VASH1 and VASH2 together with standards of bovine serum albumin.

Enzyme enrichment. We designed a three-step purification procedure from brain lysate inspired from previous efforts(*23, 35*). All steps were carried out at 4°C. Adult mice brains were homogenized in 50 mM phosphate buffer at pH 6.7, 1 mM EGTA, 1 mM MgCl₂, 1 μ g/ml DNAse with a protease inhibitor cocktail (cOmplete EDTA-free, Roche) and centrifuged 1h at 100,000 *g*. The supernatant was collected (Fraction I). In step 1 (ammonium sulfate fractionation), Fraction I was slowly brought to 45% ammonium sulfate, incubated for 15 min and centrifuged 20 min at 15,000 *g*. Resulting supernatant underwent the same procedure at 65% ammonium sulfate. The pellet was re-suspended in one-eighth of initial volume with 50 mM MES pH 6.7, 1 mM EGTA, 1 mM MgCl₂ and desalted using Bio-Gel P30 (Bio-Rad) equilibrated with the same buffer (Fraction II). In step 2 (strong anion column), Fraction II was loaded onto a 5 mL Hitrap Q XL column (GE Healthcare) connected on a BioLogic DuoFlow chromatography systems (Biorad) and unbound proteins were collected (Fraction III). In step 3 (strong cation column): Fraction III adjusted to pH 6.2 and 0.12 M NaCl, was loaded on a 5mL Hitrap SP XL

column (GE Heathcare). Proteins were eluted with a 0.12 M to 1M NaCl gradient. Protein fractions were equilibrated in 50 mM MES at pH 6.7, 1 mM EGTA, 1 mM MgCl₂ (by desalting with BioGel P-30). TCP activity assay was performed on these fractions and activity containing fractions were pooled (Fraction IV). Purification data of a typical experiment are shown in Figs. 1A and S1A. For the quick enzyme enrichment (used in Fig. S1C, E, F), brain homogenate was directly proceeded to step 3, and then desalted.

Synthesis of inhibitors of TCP activity. For full synthesis details and compound characterization see Auxiliary Information.

Click chemistry (Cu-catalyzed azide-alkyne cycloaddition, CuCAAC reaction). Fraction IV was equilibrated in phosphate buffered solution at pH 7.4 and concentrated to 2 mg/ml. Following 1h incubation at 37°C with 10 μ M of alkyne-epoY or 10 μ M of epoY (respectively clickable and control irreversible inhibitors, see structures in Fig. 1C, S2B), two equivalent volumes of azide-agarose beads (Jena Biosciences) were then added and click reaction was started by addition of 1 mM CuSO₄, 100 μ M TBTA and 1 mM TCEP. Reaction was completed in 3h at room temperature. For fluorescence labeling, 100 μ M 5/6-TAMRA-PEG3-azide (Jena Bioscience) was used instead of azide-agarose beads.

Mass Spectrometry sample preparation. Removal of non-specifically bound proteins, and peptides preparation to be analyzed were achieved according to the Click Chemistry Capture Kit protocol (Jena Bioscience). Quickly, agarose-bound proteins were reduced and alkylated. Beads were washed with 1% SDS and 8M urea. On-beads tryptic proteolysis (using Sequencing Grade Modified Trypsin, Promega) was performed and released peptides were purified on C18 cartridges (Ultra-Micro spin columns, Harvard Apparatus).

Mass spectrometry-based proteomic analyses. Peptides were analyzed by nanoliquid chromatography coupled to tandem mass spectrometry (Ultimate 3000 coupled to LTQ-Orbitrap Velos Pro, Thermo Scientific) using a 120-min gradient as described in (*36*). Peptides and proteins were identified through concomitant searches against Uniprot (March 2017 version,

Mus musculus taxonomy), classical contaminants (homemade) and the corresponding reversed databases using Mascot (version 2.5.1). The Proline software (http://proline.profiproteomics.fr) was used to filter the results (conservation of rank 1 peptides, peptide identification FDR < 1% as calculated on peptide scores by employing the reverse database strategy, and minimum of 1 specific peptide per identified protein group) before performing a compilation, grouping and comparison of the protein groups from the control and positive samples. Proteins from the contaminants database and additional keratins were discarded from the final list of identified proteins. Only proteins identified with a minimum of 3 specific spectral counts in the 3 replicates of positive samples and absent from the control samples were further considered.

Expression constructs. Mouse vasohibin-1 (VASH1) and vasohibin-2 (VASH2) cDNAs (accession numbers NM_177354 and NM_144879, respectively) were PCR-amplified and inserted into a home-made CAG promoter-containing vector, that generates proteins with a Flag tag at the N-terminus and with superfolder-GFP (sfGFP(37)) and a 6 His tag at the C-terminus (Flag-vasohibin-sfGFP-His). The corresponding control plasmid encodes Flag-sfGFP-His protein. Bicistronic plasmids allowing coupled expression of both vasohibins and SVBP were obtained by introducing, downstream of the Flag-vasohibin-sfGFP-His cDNA, a cassette containing the encephalomyocarditis virus IRES sequence followed by the cDNA encoding mouse SVBP (accession number NM_024462) with a C-terminal Myc-tag (Flag-vasohibinsfGFP-His/SVBP-Myc). Point mutations were introduced by PCR to generate enzymatically dead versions of vasohibins: C179A for VASH1 and C158A for VASH2, according to the numbering of accession numbers NP_796328 and NP_659128, respectively. The plasmid encoding mouse SVBP with C-terminal Myc and Flag tags (SVBP-Myc-Flag) was obtained from OriGene. Mouse Eb1 cDNA (accession number NM_007896) was inserted into an EGFP-tagged vector in order to generate EB1-EGFP. Plasmid encoding His-EB1 for protein production in E. coli was described in (15). cDNAs coding for human tubulin a1B and mouse tubulin a8 (accession numbers NM_006082 and NM_017379, respectively) were PCR-amplified and inserted into a vector with N-terminal mCherry tag. Point mutations in α-tubulin cDNAs were introduced by PCR to replace the last aromatic residue by an alanine: Y451A for α1B-tubulin and F449A for α8-tubulin, according to the numbering of accession numbers NP_006073 and NP_059075, respectively. Plasmid expressing mouse-specific shRNAs were from OriGene: TL511800B for *Vash1*, TL506751C for *Vash2*, TL517601B for *Svbp* and TR30021 for control. All constructs were verified by DNA sequencing.

Purification of His-tagged vasohibins from HEK293T cells. HEK293T cells cotransfected with plasmids allowing expression of GFP or active/inactive forms of vasohibins and SVBP (Flag-sfGFP-His or Flag-(dead)VASH1/2-sfGFP-His and SVBP-Myc-Flag) were lysed in Tris buffer at pH 8.0, 0.5% TritonX100, 1mM MgCl₂, 200 mM NaCl, 5 mM imidazole in the presence of protease inhibitor cocktail (cOmplete EDTA-free, Roche). After centrifugation (10 min at 16.000 *g* and 4°C), supernatants were collected and added onto 20 μ L of cobalt resin (Sigma) and incubated for 3h at 4°C. After 3 washes with lysis buffer, proteins were eluted using 200 mM imidazole, Tris buffer at pH 8.0, 1 mM MgCl₂, 200 mM NaCl. Purified proteins were equilibrated by dialysis at 4°C in 100 mM Pipes, 1 mM EGTA and 1 mM MgCl₂ and directly used in radioactivity assays.

Cell culture and transfection. Hippocampal neurons and MEFs were prepared as previously described(2). HEK293T cells were maintained under standard conditions. HEK293T cells were transfected with JetPRIME transfection reagent (Polyplus-Transfection). MEFs and neurons were transfected using Amaxa Nucleofector kits (Lonza). A ratio of 1:1 was generally used for cDNA co-transfections (for VASH1/2 with SVBP, or for mCherry-tubulin with bicistronic plasmids allowing coupled expression of VASH1/2 and SVBP.

Western-blotting and immunofluorescence. Detyrosination activity was detected using antibodies specific for tyrosinated tubulin (YL_{1/2}, Tyr-tub) or native EB1 (Tyr-EB1), and C-terminally detyrosinated tubulin (deTyr-tub) or EB1 (deTyr-EB1). Control of total tubulin or EB1 was estimated with antibodies that recognizes both species (total α -tub or α 3A1, total EB1

from BD Transduction lab.). All these antibodies were described and characterized in (15). The other primary antibodies, anti-His, anti-Flag, anti-GFP, anti-turboGFP, anti-mCherry, anti-Tau and anti-ankyrin were from Qiagen, Molecular Probes, Chromotek, Invitrogen, Sigma, Millipore and Santa-Cruz, respectively. For Western-blotting, cells were collected after 24 h of transfection. After washing with phosphate-buffered saline (PBS) medium at 37°C, cells were directly lysed in Laemmli buffer. Protein extracts were loaded on 10% acrylamide gels (Mini-PROTEAN® TGX Stain-Free[™], Invitrogen) and transferred with Trans-Blot® Turbo (BioRad). Membranes were incubated with primary and secondary antibodies conjugated with HRP and finally revealed with Chemidoc camera (Biorad). For analysis and graphical representations of immunoblots (Fig. 4b), protein bands were quantified from triplicate blots of 3 different experiments using ImageJ software (National Institutes of Health, Bethesda, MD). Detyrosinated α -tubulin signal was normalized to the total protein content of the sample estimated from a stainfree image. For immunofluorescence, cells were generally fixed at 37°C in 4% paraformaldehyde, 4.2% sucrose, phosphate buffered saline medium (PBS) (except for ankyrin staining for which methanol fixation at -20°C was used) and permeabilized using 0.1% Triton X-100, PBS. Cells were then incubated with primary antibodies, followed by incubation with secondary antibodies (see below) conjugated with either alexa-488, cyanine-3 or cyanine-5 fluorophores (1:1000). Nuclei were stained using Hoescht 33258 (1 µg/ml).

RT-PCR amplification. Messenger RNAs from cells and tissues were prepared with the Dynabeads purification kit (Invitrogen). RT-PCR were performed with the Superscript One step RT-PCR System (Invitrogen) in 12.5 μ L with 50 ng RNA. Products of respectively 697, 748 and 154 bp from mouse *Vash1*, *Vash2* and *Svbp* were amplified at 58°C by 45 cycles using the following primers: 5'-TACAAACCGCCCGCCTTCC and 5'-ACAGACCCTGACAGCTACCAACA for *Vash1*, 5'-GCAGCCTTCCATTGAGCGGT and 5'-CAGTCAACCCAGGGCTTTGCC for *Vash2*, 5'-CCAGCAGGAGCTGAAGCAAAGA and

7

5'-GCACCAGTTCCTCTGCCGGG for *Svbp*. GAPDH was amplified at 64°C by 25 cycles with 5'-TCAACGGGAAGCCCATCACCA and 5'-GTTTCTCCAGGCGGCACGTC primers.

Morphometric neuron analysis. Mosaic images of 2DIV neuron fixed and stained with antitubulin antibody were acquired with a 20X N.A 0.5 objective on a DMI6000 Leica microscope with a motorized stand. Images were segmented after enhancement with a DoG filter. The cell bodies of single neurons were manually selected and used to process neurons individually with an homemade AutoNeuriteJ macro. Briefly the neuron images were skeletonized and neuritic loops were resolved using the "Analyze Skeleton 2D/3D ImageJ plugin"(38). The ends of neurites were marked using the "BinaryConnectivity" imageJ plugin (developed by G. Landini, http://www.mecourse.com/landinig/software/software.html). Images of each neurite from their ends to the cell body were produced. Among the neurites with a path overlap, the longest was defined as primary neurite. The images of primary neurites were substracted to images of overlapping neurites, thus defining secondary neurites and number of branching. Neurite lengths were measured. Neurites with a length inferior to 12 µm were not considered in order to avoid skeletonization artifacts. An axon was defined among primary neurites of a single neuron if its length was at least 48 µm and 1.3-times longer than any other primary neurite. Using this macro we selected a minimum of 27 neurons for each condition and compared the mean axonal length, mean primary neurite number and branching frequency.

In utero electroporation, tissue processing, immunohistochemistry and analyses. A full description is available in (*39*). Briefly, embryos from anesthetized timed-pregnant mice were electropored at E14.5 with plasmids allowing expression of shRNAs (see above). Four days later (E18.5), embryonic brains were dissected, fixed, cryosectioned and placed onto slides for analyses. Anti-tGFP primary antibodies (1:300) was incubated overnight at 4°C. Nuclei were counterstained with DAPI (Roche). Images were acquired with a 20X N.A 0.5 objective on a DMI6000 Leica microscope with a motorized stand and analyzed with Image J. The cortical region where transfected cells were detected was divided into 6 bins of equal surface in which

GFP positive (GFP⁺) neurons were counted (5 embryos per condition, 3 slides per embryo). At least 260 GFP⁺ neurons were counted per embryo.

Authors Contributions:

CA performed most of the experiments (Figs 1, 2, S1-S4) and succeeded to identify brain TCP. AB initially developed TCP enzyme enrichment steps. MB designed the covalent inhibitors used to purify brain TCP. SS and NA synthesized and performed analytical characterization of the TCP inhibitors. LS together with CA worked out labeling and purification methods using the covalent inhibitors. YC performed the mass spectrometry-based proteomic analyses. CB engineered all DNA constructs. LP, PH and MJM performed the experiments with neurons and LP analyzed them. ED and BB developed AutoNeuriteJ macro used for neuron morphometric analysis. JLF electropored mouse embryos and CA quantified cortical neurons migration. FV assisted everybody for plasmids amplifications and basic biochemistry. MJM oversaw the entire project and assisted with data interpretation. AA, KR, JVD, CB, CD, LL and SH provide intellectual inputs to the project. CA, MJM and MB wrote the manuscript with the contribution of all co-authors.


Fig. S1. TCP enriched fraction prefers tubulin as substrate. (A) Table of enzyme enrichment steps from mouse brain tissue. Detyrosination activity from equal volumes of the various fractions was estimated by measuring tyrosine released from [¹⁴C]-tyrosine labeled microtubules (2 μ M) after 45 min incubation. (B) Detyrosination of tubulin and EB1 (5 μ M) by fraction IV revealed by Western-blot. A reaction with carboxypeptidase A (CPA) was used as positive control.



Fig. S2. Inhibition and identification of mouse brain TCP. (A) Screening of proteases inhibitor potencies on the activity of the enzyme-enriched fraction prepared by the quick enrichment protocol. Inhibitors were used at the supplier's highest advised concentration. Results with inhibitors are expressed as percentage of the activity in the control (mean+/-SD, n = 3-5). (B) Structure of designed inhibitors, EpoY, epoEY and epoEEY. (C) Time-dependent inhibition of putative TCP by alkyne-epoY. Fraction IV was preincubated with 1 µM alkyne-epoY and detyrosination activity was tested as in A. Results are expressed as the percentage of activity in the control (mean +/- SD, n = 3). Increasing the time of pre-incubation with alkyne-epoY enhanced its inhibitory effect, indicative of a covalent reaction between inhibitor and putative TCP. (D) Effect of substrate concentration on alkyne-epoY inhibition. Fraction IV was preincubated 3h with 1 µM inhibitor or DMSO (control) before activity measurement on radiolabeled microtubules. Results are expressed as the mean +/- SD (n = 3). Increasing levels of microtubules by 10-fold did not restore the tyrosine cleavage activity of inhibited Fraction IV. (E) Sequence of mouse vasohibin-1 (VASH1) with all the peptides (underlined in black) identified by mass spectrometry of three independent purifications. The putative catalytic triad residues are in bold. No vasohibin-1 peptide was found in the three control experiments done with epoY which is not clickable. No peptide carrying the catalytic Cys179 (underlined in red) was identified due to its covalent binding to inhibitor and agarose beads.



Fig. S3. VASH1 and VASH2 associated to SVBP are potent tubulin Tyr/Phe carboxypeptidases. (A) Immunofluorescence analysis of de/tyrosinated α -tubulin pools from MEF cells cotransfected with plasmids encoding active or inactive VASH2 and SVBP (V2 or deadV2, respectively). Carboxypeptidase activity was revealed by immunofluorescence with the same antibodies as in Fig. 2. Vasohibins were probed with anti-GFP antibody. (B) Immunoblot of protein extracts from HEK293T cells expressing mCherry- α 8-tubulin, each VASH and SVBP. Native or mutated versions of α 8-tubulin, respectively ending with EEY or EEA, were used. Levels of de/tyrosinated tubulin were measured as in Fig. 2A. Antibody to mCherry demonstrates same amounts of exogenous α -tubulin.



Fig. S4. Purification and properties of VASH/SVBP complexes. (A) Western-blot analysis (upper panels) and SDS-PAGE (lower panel) of the purification of vasohibin/SVBP complexes. Vasohibins and their catalytic dead versions were co-expressed with SVBP in HEK293T cells as in Fig. 2A and then purified on cobalt resin. A GFP construct (bearing an His-tag) was used as control. GFP and vasohibins were probed with anti-His antibody, and SVBP with anti-Flag antibody. Western-blot analyses of unpurified (lysate) and purified (eluate) protein extracts and SDS-PAGE of purified protein extract are presented. Note that SVBP (devoid of His-tag) was co-purified with all vasohibins but not with GFP. (B) Detyrosination activity of purified VASH2/SVBP complexes on purified brain microtubules or tubulin dimers assessed as in Fig. 2E. (C) Control by SDS-PAGE of non-assembled microtubule (tubulin dimers, Tub) or assembled microtubules (MT) used in Figs. 2E and S4B. MT and Tub extract (500 ng) were centrifuged 15 min at 25°C and 200,000 g. SN, supernatant. (D) Control by Western-blot of VASH1, VASH2 and SVBP amounts used in Figs. 2E and S4B.



Fig. S5. Down-regulation of SVBP alters neuronal differentiation. (A) Validation of VASH1, VASH2 and SVBP shRNAs. HEK293T cells were co-transfected with plasmids allowing expression of the protein and of the corresponding shRNA or of a control shRNA. Crude protein extracts were analyzed by Western-blot with anti-GFP and anti-Flag to test the presence of VASH1/2 or SVBP, respectively, and with anti-turboGFP to assay the presence of shRNA; (**B**-**D**) Effect of SVBP down-regulation on neurite outgrowth and axonal differentiation. Neurons were transfected as in Fig. 3B and analyzed by immunostaining at 2DIV and 3DIV. (**B**) Tyrosinated and detyrosinated α -tubulin levels were imaged at 2DIV as in Fig. 2. Levels of shRNA were imaged using an anti-tGFP antibody. (**C**) Stage III neurons (bearing an axon) were

counted manually on immunofluorescence images (generated as in B) from 3 to 4 different cultures at 2DIV and 3DIV. (**D**) Morphometric analyses of at least 27 neurons (at 2DIV) using AutoNeuriteJ macro (see Methods for details) on immunofluorescence images generated as in B. *, P<0.05; **, P<0.005; ***, P<0.0005 (*t* or Mann and Whitney tests).



Fig. S6. Effect of vasohibins or SVBP down-regulation on Tau staining of axons. Neurons were transfected by electroporation with shRNAs associated to turboGFP (tGFP) cDNA just before plating and analyzed by immunofluorescence for tyrosinated tubulin and Tau contents at 3DIV. Transfected cells were imaged using an anti-tGFP antibody.



Fig. S7. Effect of vasohibins or SVBP down-regulation on ankyrin staining of axons. Neurons were transfected by electroporation with shRNAs associated to turboGFP (tGFP) cDNA just before plating and analyzed by immunofluorescence for tyrosinated tubulin and ankyrin levels at 10DIV. Levels of shRNA were imaged using an anti-tGFP antibody.

Peptide	Start	Stop	Best Mascot Score	TCP-R1	TCP-R2	TCP-R3
KVVPSGSSSASPNAAATTTAAAAAAAAAAPHSGTK	6	39	27.48	1	-	-
VVPSGSSSASPNAAATTTAAAAAAAAAPHSGTK	7	39	58.66	2	-	1
RLETTEGASAQRDEEPEEEGEEDLR	40	64	44.40	2	-	-
DEEPEEEGEEDLR	52	64	92.22	2	-	1
DEEPEEEGEEDLRDGGVPFFINR	52	74	60.40	2	-	-
GGLPVDEATWER	75	86	59.10	3	-	1
IPIPSVPTFQPTTPVPER	114	131	69.72	3	2	1
IPIPSVPTFQPTTPVPERLEAVQR	114	137	42.11	3	-	-
ELQYNHTGTQFFEIK	141	155	53.71	1	-	-
SRPLTGLMDLAK	157	168	37.63	1	-	-
TYFSGNYFR	205	213	33.69	1	-	-
HIVLGVNFGGR	214	224	36.52	2	-	-
YGALGMSR	225	232	39.87	1	1	1
EDLMYKPPAFR	234	244	28.16	1	-	-
TLSELVLDYEAAYGR	245	259	83.16	3	-	1
LGQCVSHDPHSVEQIEWK	269	286	27.42	-	1	-
HSVLDVER	287	294	42.80	-	-	1
AMPDLSGYQIR	364	374	51.10	1	-	-
AMPDLSGYQIRV	364	375	48.64	1	-	-

Table S1. Vasohibin-1 peptides identified by mass spectrometry-based analysis (see Auxiliary Table for detailed proteomic analyses). Numbering of start and stop amino acids is according accession number NP_796328. Numbers of spectral counts (SC) are indicated for each of the 3 independent fractions prepared using the clickable inhibitor (TCP-R1 to TCP-R3). Lower amounts of purified brain extract were used in R2 and R3 than in R1 (3- and 2-fold, respectively).

Article n°2: « Evidence for new C-terminally truncated variants of α - and β - tubulins»

1. Introduction

La tubuline est sujette à de nombreuses modifications post-traductionnelles qui participent à la diversité des microtubules et ainsi à celle de leurs fonctions. Nous avons vu le cycle de détyrosination/tyrosination faisant intervenir les vasohibines/SVBP qui coupent la tyrosine C-terminale de l'alpha tubuline ainsi que la TTL qui la rajoute. A la suite de la détyrosination (laissant apparaître la séquence C-terminale -GEE), une coupure supplémentaire peut être générée libérant le pénultième glutamate de la séquence primaire formant la tubuline alpha delta-2 (-GE). Ce variant peut être généré par cinq membres de la famille des déglutamylases, les CCPs 1, 2, 3, 4 et 6 (Rogowski et al. 2010; Tort et al. 2014). Puisque la tubuline delta-2 présente un glutamate C-terminal nous nous sommes demandés si certaines CCPs seraient capables de le couper générant alors une nouvelle forme de tubuline, la tubuline alpha delta-3. Avant la publication de nos travaux, Berezniuk et al. ont alors montré que la CCP5 était capable de générer ce variant delta-3 (Berezniuk et al., 2013). Les résultats de ce deuxième article présentés ci-dessous révèlent alors non seulement l'existence physiologique de ce variant mais également les autres membres de la famille de CCPs capables de le générer.

2. Résumé

Spécificité de l'anticorps 3EG

Afin d'étudier l'existence physiologique de la tubuline alpha delta-3, nous avons développé un anticorps antipeptide dirigé contre la séquence GEGEEEG. Il a d'abord été essentiel de vérifier sa spécificité. Ainsi, en exprimant en cellules les différents variants de la tubuline alpha (tyrosinée, détyrosinée, delta-2 et delta-3) nous avons montré par Western-blot que cet antipeptide est très spécifique du variant delta-3 (**figure 1A de l'article n°2**). De plus, des mutations ponctuelles de la séquence C-terminale de l'alpha delta-3 ont permis de définir la séquence –EEEG comme épitope minimal reconnu par cet antipeptide (**figure 1B**). Cet anticorps est ainsi appelé anticorps 3EG.

Etude de la présence et de la quantité physiologique de la tubuline delta-3

Dans le but de vérifier l'existence physiologique de la tubuline alpha delta-3 nous avons analysé différents tissus de souris. Parmi ces tissus, la tubuline delta-3 semble présente uniquement dans le cerveau (**figure 2A**). L'analyse de différents types de cellules montre que la tubuline delta-3 est spécifique des neurones (**figure 2B**), ce qui est cohérent avec la présence de tubuline delta-2 également exclusivement neuronale. Cependant, contrairement à la tubuline delta-2 qui s'accumule avec le vieillissement des neurones (**figure2C**) et des souris (**figure2D et E**), la tubuline delta-3 est

enrichie dans les neurones jeunes (**figure 2C**) et montre un pic de présence dans le cerveau autour de la naissance des souris (**figure 2D et E**). Afin de mieux caractériser les espèces de tubuline alpha présentes dans le cerveau nous avons estimé leur quantité relative dans le cerveau de souris adulte et embryonnaire. Alors que dans le cerveau embryonnaire les tubulines tyrosinée, détyrosinée, delta-2 et delta-3 représentent respectivement 69, 27, 2 et 1,3%, celles-ci évoluent à 25, 45, 28 et 1% dans le cerveau adulte (**figure 2F et G**). Cohérent avec une augmentation de la détyrosination et de la tubuline delta-2 au cours du développement du cerveau, ces résultats révèlent cependant que le variant delta-3 ne représente qu'une infime proportion de la tubuline alpha totale.

Mise en évidence de la formation de tubuline delta-3 par certaines CCPs

En considérant que certaines déglutamylases génèrent la tubuline delta-2 à partir de la tubuline détyrosinée, nous avons voulu déterminer la capacité de ces enzymes à former de la tubuline delta-3. En coexprimant les différentes CCPs avec la tubuline delta-2 couplée à la mCherry, nous montrons que les CCPs 1, 4, 5 et 6 sont capables de générer la tubuline delta-3 alors que les CCPs 2 et 3 ne possèdent pas cette aptitude (**figure 3A** panneau de gauche). De manière cohérente avec les travaux précédents (Rogowski et al. 2010), nos résultats révèlent que seule la CCP5 n'est pas capable de former de la tubuline delta-2 (**figure 3A**, panneau de droite). Ces résultats soulignent des différences biochimiques entre les différents membres de la famille des déglutamylases. En effet, alors que les CCP1, 4 et 6 semblent couper indifféremment entre une glycine et un glutamate (-G-E) ou entre deux glutamates (-E-E), les CCPs 2,3 et la CCP5 montrent des spécificités de site de coupure (entre -E-E pour CCP2 et 3, ou entre –G-E pour CCP5) (schéma **figure 3F**).

Régulation de la génération de la tubuline alpha delta-3

Nous nous sommes ensuite intéressés à la régulation de la formation de delta-3. Etant donné que la formation de tubuline détyrosinée et de tubuline delta-2 nécessite la stabilisation des microtubules pour être générée, nous nous sommes demandés si cette stabilisation favorisait aussi la formation de la tubuline delta-3. De manière surprenante, dans les cellules enrichies en tubuline delta-2 (cellules HEK293T transfectées par la CCP1) la stabilisation des microtubules par traitement au taxol abolit la génération de tubuline delta-3 (**figure 3E**). La dynamique des microtubules semble donc nécessaire à l'existence de ce variant et leur stabilisation défavorable à sa formation. Ces observations révèlent un mode de régulation de la formation de tubuline delta-3 très différent de ceux des autres variants de la tubuline alpha.

Afin d'élucider les propriétés de cette tubuline, nous nous sommes intéressés à sa répartition entre les fractions de tubuline libre et polymérisée dans les neurones hippocampaux. Nous montrons ainsi que la tubuline delta-3 est majoritairement présente sous forme polymérisée (**figure 6C**, graphique de gauche). De plus, contrairement à la tubuline détyrosinée rapidement reconvertie en tubuline tyrosinée dans le cytosol lorsqu'on induit la dépolymérisation des microtubules, la tubuline delta-3 cytosolique semble persister (**figure 6C**, graphique de droite). La présence de la tubuline delta-3 à l'état de dimère suggère que la réversion de ce variant en tubuline delta-2 (ou tout autre modification de celle-ci) dans le cytoplasme, si elles existent, s'effectuent de manière lente.

Découverte d'une tubuline beta tronquée

Lors de l'analyse par Western-blot des différents tissus de souris avec l'anticorps 3EG, nous avions observé la présence d'une bande d'une cinquantaine de kilo daltons dans tous les tissus (figure 2A). Le marquage révélé par l'anticorps 3EG en immunofluorescence étant uniquement microtubulaire et la bande en Western-blot se comportant comme de la tubuline beta, nous avons supposé qu'il s'agisse effectivement d'une tubuline beta. Afin de vérifier cette hypothèse, nous avons réalisé une purification de tubuline ainsi qu'une immunoprécipitation de tubuline alpha et beta de cellules HEK293T (figure S4 et 4A). Les Western-blot de ces extraits enrichis en tubulines révèlent qu'il s'agit bien d'une tubuline beta. L'analyse en spectrométrie de masse de préparation de tubuline de cerveau de souriceaux nous permit d'identifier la bande révélée comme correspondant à la tubuline beta2A/B tronquée de ses quatre derniers acides aminés -EDEA, ainsi nommée beta delta4 (figure 4C et D). La tubuline beta delta4 est ubiquitaire (figure 5B). Enfin, la surexpression des CCPs dans les cellules HEK293T ne semble pas suffisante pour faire varier la quantité de beta delta4 (figure 5C).

3. Discussion et perspectives

La tubuline delta-3, une variant singulier

Dans ce manuscrit, nous montrons l'existence physiologique d'un variant neuronal, la tubuline alpha delta-3. La quantification des espèces de tubuline alpha révèle que la tubuline delta-3 ne représente pas plus de deux pourcents de la tubuline dans le cerveau de souris. De plus, ce variant présente une distribution temporelle unique avec un enrichissement observé autour de la naissance. Ces observations suggèrent que ce variant possède un rôle précis et notamment au cours du développement dont l'élucidation nécessitera l'étude de ses spécificités moléculaires.

Le profil de régulation de ce variant apparaît singulier. En effet, la tubuline delta-3 qui est majoritairement microtubulaire, est générée par les déglutamylases à partir de la tubuline delta-2. Cela signifie que la persistance et le vieillissement du microtubule permettant la génération de la tubuline détyrosinée puis de la tubuline delta-2 sont nécessaires à sa formation. Cependant lorsque l'on stabilise les microtubules par traitement taxol la génération de la tubuline delta-3 est abolie. Ces observations suggèrent qu'un regain de dynamique de microtubules âgés est essentiel à la génération de tubuline delta-3. La présence de tubuline delta-3 sur les microtubules dynamiques pourrait être expliquée par une préférence des CCPs générant la tubuline delta-3 pour la tubuline dimérique (voir **figure 25**).



Figure 25 : La présence de tubuline delta-3 semble nécessiter un regain de la dynamique de microtubules persistants.

Modifications de la beta tubuline : mise en évidence d'une modification ubiquitaire

Malgré le fait que l'on connaisse les modifications post-traductionnelles de la séquence primaire de la tubuline alpha depuis presque 40 ans, très peu d'études se sont intéressées à celles de la tubuline beta. En effet, concernant les Mammifères, seuls les travaux de Miller et collaborateurs font mention de l'existence d'une tubuline beta tronquée (Miller et al. 2008). Il s'agit de la tubuline beta2C débarrassée de ces deux derniers acides aminés qui est retrouvée dans le foie de rat. Egalement, Multigner et al. ont décrit la présence d'une tubuline beta dont les trois derniers acides aminés sont supprimés (Multigner et al. 1996). Nos travaux mettant en évidence l'existence d'un variant de tubuline beta2A/B tronquée de quatre acides aminés –EDEA révèle ainsi pour la première fois une modification physiologique et ubiquitaire de la séquence primaire de la tubuline beta. Ils révèlent également que les tubulines alpha et beta peuvent avoir un C-terminus similaire (-EEEG) et de ce fait une éventuelle fonction commune. Il sera alors intéressant de clarifier son rôle physiologique en identifiant les partenaires protéiques spécifiques.

De nouvelles enzymes de modifications de la séquence primaire des tubulines

L'existence de cette tubuline beta tronquée pose la question des enzymes responsables de sa

génération. Il pourrait s'agir d'une endopeptidase qui couperait entre la glycine et le glutamate libérant alors directement les quatre acides aminés. D'autre part, sachant que les CCPs 2 et 3 sont capables de couper des aspartates (Tort et al. 2014), nos travaux suggèrent qu'il pourrait exister d'autres tubulines carboxypeptidases capables de couper des alanines. Dans ces deux cas, ces hypothèses suggèrent l'existence de carboxypeptidases encore été non-identifiées.

4. Conclusion

En utilisant un nouvel antipeptide spécifique de la séquence C-terminale –EEEG appelé 3EG, nous avons mis en évidence l'existence physiologique d'un nouveau variant de tubuline alpha, la tubuline delta-3. La tubuline alpha delta-3 est générée par les CCPs 1, 4, 5 et 6 à partir de tubuline delta-2. Contrairement à la tubuline delta-2 qui s'enrichit dans les microtubules très stables, la production de cette forme de tubuline nécessite la dynamique des microtubules. Ce variant est spécifiquement neuronal et est enrichi durant le développement du cerveau de souris suggérant un rôle précis de cette tubuline. L'utilisation de l'anticorps anti-3EG nous a également permis d'identifier une tubuline beta ubiquitaire tronquée de quatre acides aminés, la beta2A/B delta4. L'étude des spécificités moléculaires de ces deux variants permettra de dévoiler leurs fonctions physiologiques.

L'ensemble de ces travaux participe à la révélation de la une complexité grandissante des modifications post-traductionnelles de la tubuline ainsi que celle de la régulation des nombreuses enzymes qui les génèrent.

Evidence for new C-terminally truncated variants of α - and β -tubulins

Chrystelle Aillaud^{a,b}, Christophe Bosc^{a,b}, Yasmina Saoudi^{a,b}, Eric Denarier^{a,b,c}, Leticia Peris^{a,b}, Laila Sago^d, Nicolas Taulet^e, Adeline Cieren^{a,b}, Olivia Tort^{f,g,h,i}, Maria M. Magiera^{g,h,i}, Carsten Janke^{g,h,i}, Virginie Redeker^{d,j}, Annie Andrieux^{a,b}, and Marie-Jo Moutin^{a,b,*}

^aUniversité Grenoble Alpes, Grenoble Institut des Neurosciences, GIN, F-38000 Grenoble, France; ^bInserm, U1216, F-38000 Grenoble, France; ^cCEA, BIG-GPC, F-38000 Grenoble, France; ^dService d'Identification et de Caractérisation des Protéines par Spectrométrie de masse, CNRS, 91198 Gif-sur-Yvette, France; ^eCentre de Recherche de Biochimie Macromoléculaire, CNRS, 34293 Montpellier, France; ^fInstitut de Biotecnologia i de Biomedicina, Department of Biochemistry and Molecular Biology, Universitat Autònoma de Barcelona, 08193 Bellaterra (Barcelona), Spain; ^gInstitut Curie, 91405 Orsay, France; ^hParis Sciences et Lettres Research University, 75005 Paris, France; ⁱCentre National de la Recherche Scientifique, UMR3348, 91405 Orsay, France; ⁱParis-Saclay Institute of Neuroscience, CNRS, 91198 Gif-sur-Yvette Cedex, France

ABSTRACT Cellular α-tubulin can bear various carboxy-terminal sequences: full-length tubulin arising from gene neosynthesis is tyrosinated, and two truncated variants, corresponding to detyrosinated and $\Delta 2 \alpha$ -tubulin, result from the sequential cleavage of one or two C-terminal residues, respectively. Here, by using a novel antibody named 3EG that is highly specific to the -EEEG C-terminal sequence, we demonstrate the occurrence in neuronal tissues of a new $\alpha\Delta3$ -tubulin variant corresponding to $\alpha1A/B$ -tubulin deleted of its last three residues (EEY). $\alpha\Delta 3$ -tubulin has a specific distribution pattern: its quantity in the brain is similar to that of $\alpha\Delta 2$ -tubulin around birth but is much lower in adult tissue. This truncated $\alpha 1A/B$ -tubulin variant can be generated from $\alpha\Delta 2$ -tubulin by the deglutamylases CCP1, CCP4, CCP5, and CCP6 but not by CCP2 and CCP3. Moreover, using 3EG antibody, we identify a C-terminally truncated β-tubulin form with the same –EEEG C-terminal sequence. Using mass spectrometry, we demonstrate that β 2A/B-tubulin is modified by truncation of the four C-terminal residues (EDEA). We show that this newly identified $\beta\Delta4$ -tubulin is ubiquitously present in cells and tissues and that its level is constant throughout the cell cycle. These new C-terminally truncated α - and β -tubulin variants, both ending with –EEEG sequence, are expected to regulate microtubule physiology. Of interest, the $\alpha\Delta3$ -tubulin seems to be related to dynamic microtubules, resembling tyrosinated-tubulin rather than the other truncated variants, and may have critical function(s) in neuronal development.

INTRODUCTION

Tubulin is subject to a large number of posttranslational modifications that are evolutionarily conserved. Most of these modifications generate chemical marks at the C-terminal tail of tubulin that project

This article was published online ahead of print in MBoC in Press (http://www .molbiolcell.org/cgi/doi/10.1091/mbc.E15-03-0137) on January 6, 2016.

*Address correspondence to: Marie-Jo Moutin (moutinm@univ-grenoble-alpes.fr).

Abbreviations used: $\alpha\Delta 2/\alpha\Delta 3$ -tubulin, α -tubulin truncated of two/three C-terminal amino acids; $\beta\Delta 4$ -tubulin, β -tubulin truncated of four C-terminal amino acids;

outside microtubules and might, by regulating interactions with pro-

tein partners, select microtubules for specific cellular functions

(Janke and Bulinski, 2011). Among these modifications is the cycle

Supplemental Material can be found at: http://www.molbiolcell.org/content/suppl/2015/12/27/mbc.E15-03-0137v1.DC1 Monitoring Editor

Kerry S. Bloom University of North Carolina

Received: Mar 10, 2015 Revised: Dec 8, 2015 Accepted: Dec 22, 2015

640 | C. Aillaud et al.

C.A. performed and analyzed most of the experiments. C.B. performed the cloning of α -tubulin variant expression constructs. Y.S. and A.C. were involved in initiation of the project and with immunocytochemistry. L.S. and V.R. performed mass spectrometry. N.T. prepared synchronized HeLa cells. L.P. supervised neuronal cultures. E.D. helped with image quantification. O.T. and C.J. obtained the active CCP2 and CCP3 expression plasmids. M.M. provided TTLL1-knockout animal tissues. M.J.M. supervised the study and wrote the article. A.A., V.R., C.B., and E.D. participated in writing the article.

CCP, cytosolic carboxypeptidase. © 2016 Aillaud et al. This article is distributed by The American Society for Cell Biology under license from the author(s). Two months after publication it is available to the public under an Attribution–Noncommercial–Share Alike 3.0 Unported Creative Commons License (http://creativecommons.org/licenses/by-nc-sa/3.0). "ASCB®," "The American Society for Cell Biology®," and "Molecular Biology of the Cell[®]" are registered trademarks of The American Society for Cell Biology.

of tyrosine removal and re-addition at the C-terminus of α -tubulin and the further cleavage of the penultimate glutamate, leading to the formation of α -tubulin truncated of two C-terminal amino acids ($\alpha\Delta 2$ -tubulin; Paturle-Lafanechere et al., 1991). Another modification that generates a huge variety of C-terminal tail versions is the enzymatic polyglutamylation of both α and β subunits. This modification consists in addition of glutamate chains on the lateral chain of specific glutamate residues present in the primary sequences of the C-terminal region of tubulins (for review, see Janke and Bulinski, 2011).

The cycle of detyrosination/tyrosination involves two enzymes: an unidentified peptidase (tubulin carboxypeptidase [TCP]) producing detyrosinated tubulin, and a ligase that re-adds the tyrosine (tubulin tyrosine ligase [TTL]). TTL was discovered in 1993 (Ersfeld et al., 1993) and shown to be essential for neuronal organization and tumor growth obstruction (Lafanechere et al., 1998; Erck et al., 2005). Polyglutamylation is generated by two families of enzymes: the glutamylase family, which has nine TTL-like enzymes (Janke et al., 2005; van Dijk et al., 2007), and the deglutamylase family, which includes six cytosolic carboxpeptidases (CCPs; Rogowski et al., 2010; Moutin et al., 2011; Tort et al., 2014). Polyglutamylases differ in their preference for α - or β -tubulins and also for either sidechain initiation or elongation. Deglutamylases can either remove the branch points of the glutamate side chains from the tubulin backbones or hydrolyze peptide bonds between glutamate residues of linear chains. Deglutamylases were also shown to cleave the C-terminal glutamate from detyrosinated tubulin to generate $\alpha\Delta 2$ tubulin (Rogowski et al., 2010; Tort et al., 2014).

The understanding of the molecular functions of each of these modifications in cells has progressed in recent years. The C-terminal tyrosine of α -tubulin was shown to be crucial for positioning of CAP-Gly proteins at microtubule plus ends and essential for proper functioning of depolymerizing motors of the kinesin-13 family (Badin-Larcon et al., 2004; Peris et al., 2006; 2009; Bieling et al., 2008). Detyrosinated tubulin has been shown to regulate the binding and motor activity of processive kinesin-1 in cells (Liao and Gundersen, 1998; Dunn et al., 2008; Cai et al., 2009). An effect of microtubule detyrosination on processive motor functioning was also shown by in vitro experiments (Kaul et al., 2014; Sirajuddin et al., 2014). However, the regulation mechanism of this modification on motor transport is controversial. No molecular role has been determined for $\alpha\Delta 2$ -tubulin. Because it accumulates in differentiated cells, it was proposed to irreversibly lock microtubules in a detyrosinated state, thus helping to permanently stabilize them (Paturle-Lafanechere et al., 1994). Polyglutamylation was shown to stimulate spastinmediated microtubule severing and thus to participate in regulating microtubule dynamics and stability (Lacroix et al., 2010). Controlling the extent of polyglutamylation of tubulins is critical for neuron survival, as shown by studying pcd (Purkinje cell degeneration) mice, which lacks functional CCP1 (Rogowski et al., 2010). In these mice, tubulin hyperglutamylation leads to massive degeneration of particular neuron species.

In the brain, tubulins are very abundant and very heterogeneous, and this is essentially due to the presence of several tubulin isotypes arising from several genes and their polyglutamylation and detyrosination-linked modifications (Edde et al., 1990; Alexander et al., 1991; Redeker et al., 1992, 1996, 1998; Redeker, 2010; Rudiger et al., 1992, 1995; Mary et al., 1994). Microtubules from neurons are known to carry elevated levels of polyglutamylated α - and β -tubulins (for review, see Janke and Bulinski, 2011), as well as high levels of detyrosinated and $\Delta 2\alpha$ -tubulin (Paturle-Lafanechere et al., 1994; Redeker et al., 1996). Because $\alpha\Delta 2$ -tubulin ends with a glutamate residue and some deglutamylases of the CCP family were shown to be able to cleave this residue in in vitro experiments (Berezniuk et al., 2012, 2013), we wondered whether a new variant corresponding to α -tubulin truncated of three C-terminal amino acids ($\alpha\Delta3$ -tubulin) could exist in cells and tissues. We therefore developed an antibody against this putative form of α -tubulin, which we showed is highly specific to the –EEEG C-terminal sequence. Using this antibody, we demonstrated for the first time the occurrence of a $\Delta3$ form of α -1A/B-tubulin in the brain under physiological conditions. Our novel antibody also allowed us to identify a new β -tubulin variant ending with the same C-terminus as $\alpha\Delta3$ -tubulin and corresponding to the C-terminally truncated $\beta2A/B$ -tubulin, as demonstrated by mass spectrometry. Thus we showed that both α - and β -tubulin are broadly modified by C-terminal amino acid truncation.

RESULTS

3EG, a new antibody specific to the –EEEG C-terminal sequence

To study the possible occurrence of a new variant of α -tubulin missing its three C-terminal amino acids in cells and tissues, we developed polyclonal antibodies directed against peptide GE-GEEEG, corresponding to the seven terminal amino acids of α 1A/B-tubulin without the EEY C-terminal tail. Sera from rabbits were tested for dilution and specificity by both Western blotting and immunocytochemistry.

The new antibodies (called 3EG), together with anti-tyrosinated α -tubulin (Wehland and Willingham, 1983), anti-detyrosinated α -tubulin, and anti- $\Delta 2\alpha$ -tubulin (Paturle-Lafanechere et al., 1994) antibodies, were tested by Western blots on extracts of HEK293T cells expressing different α -tubulins varying in their C-terminus and fused to mCherry at their N-terminus. Anti-total α -tubulin (α tot; Erck et al., 2005) was used as control of expressed mCherry- α -tubulins (95 kDa). As shown in Figure 1A (and quantified in Supplemental Table S1), each antibody is specific, and 3EG antibody is exclusively sensitive to $\alpha\Delta$ 3-tubulin. Faint bands are observed with anti- α Tyr and anti- $\alpha\Delta 2$ using extracts of cells expressing mCherry- α deTyr-tubulin. They are very probably the result of endogenous TTL or CCP, respectively, adding a tyrosine residue or cleaving a glutamate residue on the mCherry-tubulin.

To further characterize the sequence specificity of the 3EG antibody, we examined the effect of different epitope mutations, allowing us to examine the reactivity of the antibody for the proteins from the seven α -tubulin genes (Figure 1B). Figure 1C illustrates that this novel antibody recognizes the four residues EEEG, with the glycine residue carrying the COOH. Changing the upstream glycine to a glutamate (using mCherry- α EEEEG) does not alter antibody reactivity. In contrast, modifying the two first glutamate residues of the EEEG motif leads to disappearance (as with mCherry- α GDDEG, - α GAEEG, and - α GENEG) or large reduction (as in the case of mCherry- α GEDEG) of staining. Figure 1B also shows that the C-terminal residue has a major antigenic character. Indeed, the antibody does not stain α -tubulin ending with an alanine instead of a glycine residue (a mutation that chemically represents only a small change of the lateral chain).

We also tested the 3EG antibody in immunocytochemistry experiments. We transfected fibroblasts with mCherry– $\alpha\Delta3$ -tubulin and its mutated forms. We obtained comparable results to those observed by Western blot: 3EG was highly specific to fusion proteins ending with EEEG (Figure 1D; not all mutations are shown). Nonetheless, the antibody gave no signal with mCherry– α -GEDEG, in contrast to the slight staining obtained in the Western blot.





Taken together, our results show that the new antibody we developed is highly specific to –EEEG C-termini (and was therefore named 3EG) and can be used in Western blot and immunocytochemistry experiments. Thus, although C-termini of α -tubulin genes share many amino acids, α 1A/B, and to a lesser extent α 4A, are the only ones stained by 3EG in Western blots, and only α 1A/B is marked by 3EG in immunocytochemistry (Figure 1C). We thus used the 3EG antibody to examine by Western blot the possible occurrence of endogenous α Δ3-tubulins in mouse cells and tissues.

Evidence for $\alpha\Delta3$ -tubulin in the brain and neurons

We prepared crude protein extracts from several organs of adult and neonate mice, including the brain, skeletal muscle, heart, kidney, stomach, and spleen. We also extracted proteins from brains at

642 | C. Aillaud et al.

different ages and from different brain structures. Among all tissues tested, $\alpha\Delta3$ -tubulin is present only in the brain in both neonates (Figure 2A) and adults. Moreover, $\alpha\Delta3$ tubulin is present in all brain regions analyzed (Supplemental Figure S1; neonate brain).

Surprisingly, in all tissues studied, we detected another protein that also reacts with 3EG antibody below the α -tubulin region, which thus does not correspond to $\alpha\Delta3$ -tubulin (Figure 2A). We characterized this other protein as β -tubulin, as will be shown later. In most of the following figures for $\alpha\Delta3$ -tubulin, the lower, β -tubulin band is not shown.

Analysis of $\alpha\Delta3$ -tubulin occurrence in different cell types, including fibroblasts, astrocytes, and neurons prepared from either the hippocampus or brain cortex, showed that $\alpha \Delta 3$ -tubulin is solely present in neurons (Figure 2B). We studied its amount in hippocampal neurons at different days of differentiation in vitro (DIV; Figure 2C), from 3 to 21 DIV. We found that $\alpha\Delta3$ -tubulin level was elevated from 3 to 14 DIV (corresponding to the time of axogenesis and then dentritogenesis of these neuronal cells) and largely decreases at 21 DIV. In contrast, $\alpha\Delta 2$ -tubulin is more abundant in differentiated neurons, as already described (Lafanechere and Job, 2000). We found that, in hippocampus neurons, the $\alpha\Delta 2\text{-tubulin}$ level significantly increases at 14 DIV and is still much higher at 21 DIV, when spinogenesis occurs.

We examined the presence of $\alpha\Delta3$ tubulin in the brain from embryonic day 13.5 (E13.5) to adult. Figure 2D shows a typical Western blot, and Figure 2E shows the quantification of the blots. We find that $\alpha\Delta3$ tubulin tends to have higher levels in the brain during embryonic stages and around birth and decreases later. In the adult brain, the level of $\alpha\Delta3$ -tubulin is approximately three times lower than around birth. In contrast, the $\alpha\Delta2$ -tubulin level increases in brain tissue throughout life, from the embryonic

stage to adulthood. In the adult brain, the amount of $\alpha\Delta 2$ -tubulin is ~4 times the amount at birth and >10 times the amount at E13.5.

Status of the C-terminal truncations of the $\alpha\text{-tubulin}$ C-terminus in the brain

To further characterize α -tubulin species present in the brain, we quantified their distribution. Equal quantities of protein extracts from neonate and adult brains were subjected to immunoblot analysis with antibodies recognizing either the unmodified C-terminal α -tubulin tail (tyrosinated tubulin) or its processed versions (detyrosinated, $\alpha\Delta 2$ -, or $\alpha\Delta 3$ -tubulin; Figure 2F). Extracts from HEK293T cells transfected with the corresponding forms of mCherry- α -tubulin were coanalyzed (Supplemental Figure S2). The α tot antibody was used for equal loading of brain extracts or of HEK293T extracts



FIGURE 2: add-Tubulin, a neuronal variant enriched around mouse birth. Equal quantities of proteins extracted from various tissues and cell types were subjected to immunoblot analysis. Protein levels were controlled using α tot antibody. (A) Immunoblot of crude protein extracts from the indicated neonate mouse tissues. (B) Immunoblot of protein extracts from the indicated cell types, including cortical and hippocampal neurons cultured 2 or 7 DIV. (C) Immunoblot of hippocampal neurons at different stages of culture. (D) Immunoblot of crude protein extracts from mouse brains at different stages of development, including E13.5 and E18.5, postnatal days 1, 8, 15 and 21 (P1-21), and adult (Ad). Mixes of four or five half-brains were used at each developmental stage. (E) Quantitative analysis of three immunoblots for $\alpha \Delta 3$ and of five immunoblots for $\alpha \Delta 2$ realized as in D with brain protein extracts. In each immunoblot, values obtained were normalized to the value obtained at P8. Error bars indicate SEM; a.u., arbitrary units. (F) Immunoblot of protein extracts from neonate (P1) and adult mouse brains (same extracts as in D). These samples were coanalyzed with extracts from HEK293T cells transfected with the various mCherry-a-tubulin variants (Supplemental Figure S2). (G) Quantitative analysis of immunoblots such as those presented in Supplemental Figure S2. Mixtures of five neonate brains and five adult half-brains were analyzed in two series of Western blots. The plotted values represent the percentages of the different forms of α -tubulin in brains estimated after normalization to total α -tubulin levels (with α tot antibody) and to antibody sensitivity (using modified mCherry- α -tubulins) as explained in Materials and Methods. (H) Immunoblot of crude protein extracts from wild-type (WT) and TTLL1-knockout mouse brains.

expressing the mCherry-tagged α -tubulin variants. This experiment provides an estimate of the sensitivity of each tested antibody based on the immunoblot signal of the corresponding mCherrytagged variant (Supplemental Figure S2) and then allows the approximation of the quantity of each variant of α -tubulin in the extracts (Figure 2, F and G). We estimated that tyrosinated, detyrosinated, $\alpha\Delta 2$ -, and $\alpha\Delta 3$ -tubulin variants, respectively, correspond to 69, 27, 2, and 1.3% of the total α -tubulin present in the neonate mouse brain. In adult brain tissue, α -tubulin variants were estimated as being divided into 25% tyrosinated, 45% detyrosinated, 28% $\alpha\Delta 2$, and 1% $\alpha\Delta 3$ of the total α -tubulin.

Because tubulin polyglutamylation is high in the adult brain and occurs in the vicinity of the sequence recognized by the 3EG antibody, we wondered whether this might affect the 3EG signal. We thus quantified the amount of 3EG signal in TTLL1-knockout brain extracts, which exhibit very low levels of glutamylation (Janke *et al.*, 2005), and observed no difference from wild-type brain extracts (Figure 2H). In controls, the tubulin polyglytamylation revealed by the polyE antibody almost completely disappeared from TTLL1deficient extracts. Thus polyglutamylation does not alter 3EG antibody binding to tubulins.

Taken together, our results demonstrate the physiological occurrence of $\alpha\Delta3$ -tubulin in brain tissue and particularly in neuronal cells. Although this pool of α -tubulin is not abundant, it is present in the brain and neurons at very specific stages. It is noteworthy that in the neonate brain, $\alpha\Delta3$ -tubulin is present in a similar quantity to that of $\alpha\Delta2$ -tubulin.

Specificity of deglutamylases involved in processing α -tubulin primary chain

Considering that deglutamylases from the CCP family catalyze removal of glutamate side chains of α - and β -tubulins and also deglutamylation of detyrosinated α -tubulin to form $\alpha\Delta 2$ (Rogowski et al., 2010; Tort et al., 2014), we tested their ability to produce the $\alpha\Delta 3$ tubulin variant. We analyzed protein extracts from HEK293T cells coexpressing mCherry-tagged $\alpha\Delta 2$ tubulin and each of the CCPs. Results are presented in Figure 3A, with analysis of mCherry-tagged α -tubulin (95 kDa) on the left and examination of endogenous α tubulin (55 kDa) on the right. We find that CCP1, CCP4, CCP5, and CCP6 are competent to form $\alpha\Delta3$ -tubulin from expressed mCherry– $\alpha\Delta 2$ -tubulin (Figure 3A, left, row 2). In contrast, CCP2 and CCP3 seem to lack this ability. As already described (Rogowski et al., 2010; Tort et al., 2014), all CCPs except CCP5 generate the $\alpha\Delta 2$ variant from endogenous α -tubulin present in HEK293T cells (Figure 3A, right, top). Moreover, our data illustrate that only CCP1 and CCP6 are sufficiently efficient to form $\alpha\Delta3$ -tubulin from endogenous α tubulin (Figure 3A, right, row 2): these two enzymes sequentially remove the two glutamate residues from endogenous detyrosinated tubulin, producing $\alpha\Delta 2$ - and then $\alpha\Delta 3$ -tubulin.

We also studied the activity of two of the deglutamylases, CCP1 and CCP5, in generating the $\alpha\Delta3$ variant from $\alpha\Delta2$ -tubulin by immunocytochemistry on fibroblasts from TTL-knockout mice. Compared with wild type, fibroblasts isolated from TTL-knockout animals contain high levels of detyrosinated α -tubulin, as shown previously (Peris *et al.*, 2006), and $\alpha\Delta2$ -tubulin (Figure 3B). Hence they contain high amounts of substrate allowing $\alpha\Delta3$ -tubulin formation. However, as in the wild-type fibroblasts (Figure 2B), the $\alpha\Delta3$ -tubulin variant is not detected in the TTL-knockout fibroblasts (Figure 3B). Figure 3C shows that the expression of CCP5 (green fluorescent protein [GFP]–positive cells) induces an important increase in 3EG antibody labeling on microtubules (the same results were obtained with CCP1; unpublished data). Figure 3D shows an analysis of the fluorescence levels within cells expressing either CCP1 or CCP5 (GFP-positive cells) compared with the level within cells that do not express the enzymes (GFP-negative cells). Both CCP1 and CCP5 largely increase microtubule staining by 3EG antibody in TTL-knockout fibroblasts, reflecting their capacity to generate $\alpha\Delta3$ -tubulin. However, these two enzymes differ in their ability to form $\alpha\Delta2$ -tubulin, as observed when studying their action on detyrosinated mCherry-tagged α -tubulin. Whereas CCP1 is able to process mCherry-deTyr-tubulin to generate the mCherry- $\alpha\Delta2$ variant, CCP5 is not competent (Supplemental Figure S3)

On the basis of all of these data, we conclude that CCP1, CCP4, and CCP6 are able to form $\alpha\Delta2$ -tubulin from detyrosinated tubulin (cleavage of E-E) and $\alpha\Delta3$ -tubulin from $\alpha\Delta2$ -tubulin (cleavage of G-E). Thus, unpredictably, these three enzymes are capable of cleaving both E-E and G-E bonds. CCP2 and CCP3 are able to generate $\alpha\Delta2$ -tubulin but seem incompetent to produce $\alpha\Delta3$ -tubulin, and thus cleave E-E but not G-E bonds. CCP5, which is incompetent to cleave between two glutamates residues on the primary chain of α -tubulin to form $\alpha\Delta2$ -tubulin, is efficient to cut between a glycine and a glutamate to generate $\alpha\Delta3$ -tubulin from $\alpha\Delta2$ -tubulin. Hence CCP2/3 and CCP5 seem to have different cleavage site preference (G-E vs. E-E), whereas CCP1/4/6 do not. Figure 3F summarizes these results.

We then wondered whether stabilizing microtubules could influence the generation of truncated variants and CCP activities as in the case of TCP. It is indeed well known that when living cells are incubated in the presence of the stabilizing drug paclitaxel, microtubules become more detyrosinated due to the action of TCP (Wehland and Weber, 1987; Contin and Arce, 2000). Detyrosinated tubulin represents the initial substrate for $\alpha \Delta 3$ -tubulin formation by CCPs, being first transformed in $\alpha\Delta 2$ -tubulin and subsequently in $\alpha\Delta$ 3-tubulin. We examined the effect of stabilizing microtubules with paclitaxel on the formation of the truncated variant levels using wild-type and TTL-knockout fibroblasts, the latter already containing a high amount of $\alpha\Delta 2$ -tubulin. We found that although incubation with 15 µM paclitaxel for 2 h induced a significant increase of α deTyr-tubulin in both types of cells, neither $\alpha\Delta$ 2-tubulin formation nor $\alpha\Delta$ 3-tubulin formation was observed (Figure 3B). We obtained comparable results when using HEK293T cells expressing CCP1 subjected to the same drug treatment for 2 h (unpublished data). Thus, stabilizing microtubules for 2 h does not activate the CCP enzymes in charge of $\alpha\Delta 2$ - and $\alpha\Delta 3$ -tubulin formation, in contrast to what is observed with TCP. Given that activities of CCPs expressed in these cells are low (Rogowski et al., 2010), we then tested the effect of paclitaxel added for a long time at lower concentrations (50-200 nM) on HEK293T cells expressing CCP1. We added the drug 2 h after CCP1 transfection and for 24 h. In this latter case, we observed both an increase of $\alpha\Delta 2$ -tubulin and a decrease of $\alpha\Delta 3$ tubulin produced by the enzyme (Figure 3E, 50 nM paclitaxel). Hence generation of the truncated variants by CCP enzymes most probably relies on complex mechanisms related, at least in part, to microtubule dynamics. The reduction of these dynamics produces antagonistic effects on the generation of $\alpha\Delta 2$ -tubulin and $\alpha\Delta$ 3-tubulin.

β -Tubulin can be shortened at its C-terminus: evidence for ubiquitous $\beta\Delta4$ variant

In all tissues (Figure 2A) or cells (Figure 4A) studied, we detected a protein band reacting with 3EG antibody just below the α -tubulin band, which thus does not correspond to $\alpha\Delta3$ -tubulin. Migration of the two bands stained by the antibody is sensitive to the purity of the SDS used, as bands were effectively separated when less-pure



FIGURE 3: Specificity of CCP enzymes in producing $\alpha\Delta 2$ and $\alpha\Delta 3$. (A) Immunoblot of protein extracts from HEK293T cells coexpressing each GFP- or yellow fluorescent protein (YFP)–tagged CCP and mCherry– $\alpha\Delta 2$ -tubulin. Analysis of mCherry– α -tubulin (left) and endogenous α -tubulin (right). (B) Immunoblot of protein extracted from WT and TTL-knockout (TTL KO) fibroblasts after incubation with dimethyl sulfoxide (DMSO: control) or paclitaxel (15 μ M) for 2 h. TTL KO cells contain high levels of detyrosinated and $\alpha\Delta 2$ -tubulin, but no $\alpha\Delta 3$ -tubulin is detected. The reactive 3EG band corresponds to β -tubulin (Figure 4). (C) Immunocytochemistry of TTL KO fibroblasts transfected with GFP-CCP5 and immunostained with anti– α Tyr-tubulin and 3EG antibody. Scale bar: 20 μ m. CCP5 leads to the formation of $\alpha\Delta 3$ -tubulin. (D) Quantitative analysis of immunocytochemistry experiments as in C using TTL KO fibroblasts transfected with either GFP-CCP1 or GFP-CCP5. Fluorescence was measured as explained in *Materials and Methods*. (E) Immunoblot of protein extracted from HEK293T cells expressing GFP-CCP1 or not after incubation with DMSO (control) or paclitaxel (50 nM) for 24 h. (F) Schematic representation of the C-terminal amino acids of α 1A/B-tubulin, 3EG epitope (red), and processing enzymes associated with the generation of the variants.



FIGURE 4: Evidence for a ubiquitous truncated form of β -tubulin. (A) Immunoblot of crude extracts from the indicated mouse tissues (same experiment as Figure 2B, but with the lower protein bands included). Protein levels were controlled using α tot antibody. (B) Immunoprecipitation of endogenous α - and β -tubulins from HEK293T cells and neonate mouse brain using α tot (IP α) and β tot (IP β) antibodies and analysis with 3EG antibody. The quality of immunoprecipitations was controlled using α tot and β tot antibodies together with mouse TrueBlot secondary antibodies. (C) Alignment of C-termini from the eight mouse β -tubulin isotypes. The β tot antibody epitope is in blue, and the 3EG epitope is in red. (D) Identification of the C-terminal peptide of the truncated β 2A/B-tubulin (Δ EDEA) from neonatal mouse brain. The MS/MS spectrum of the peptide ion with m/z = 649.24, corresponding to an experimental monoprotonated mass MH+ of 1296.4632 Da, is annotated. The *b*- and *y*-type fragments identified are indicated on the sequence of the C-terminal peptide DEQGEFEEEEG, with a theoretical mass MH+ of 1296.4630 Da. Loss of H₂O and NH₃ is labeled with asterisks and open dots, respectively.

SDS was used. This well-known comportment of α - and β -tubulins from the tubulin dimer (Best et al., 1981) led us to suspect that the second protein stained by 3EG antibody could be β -tubulin. After purification of tubulins from adult and neonate brains by a cycle of microtubule assembly and disassembly, we found the same 3EG labeling, which strongly suggests that the two bands correspond to the two tubulin monomers (Supplemental Figure S4). To confirm our hypothesis, immunoprecipitation experiments with anti– α -tubulin (αtot) and anti–β-tubulin (βtot) antibodies were done on crude protein extracts from HEK293T cells and neonate brains. The assays were performed in experimental conditions allowing separation of the tubulin monomers, in medium containing Tris buffer as in Giraudel *et al.* (1998). Results presented Figure 4B show that the protein present in the lower 3EG band from both extracts is immunoprecipitated by the anti–β-tubulin antibody, whereas the αΔ3 variant from brain extract is immunoprecipitated by αtot. As illustrated





FIGURE 5: The novel β 2A/B-tubulin variant β Δ 4 evidenced in HeLa cells by 3EG antibody. (A) Immunocytochemistry of HeLa cells using 3EG and anti- β -tubulin antibody (β tot). Scale bar: 10 µm. (B) Immunoblot of protein extracts from nonsynchronized HeLa cells and from HeLa cells synchronized in G1/S or mitosis (see *Materials and Methods*). Cell synchronization was verified using a phosphohistone antibody (H3-Ser10P). Loaded proteins were standardized using α tot antibody, and the truncated β -tubulin form was analyzed with 3EG antibody. (C) Analysis of the β -tubulin band in protein extracts from HEK293T cells expressing GFP- or YFP-tagged CCPs (complementary analysis of the experiment in Figure 3A, right, including lower band).

Figure 4C, none of the β -tubulin isotypes encoded by the eight mouse genes contains an -EEEG sequence at its C-terminus. However, the sequence is present upstream within the C-terminal region of β 2A/B-, β 2C-, and β 3-tubulin isotypes. To identify the β monomer subjected to C-terminal cleavage, we separated tubulins purified from neonate brains by SDS-PAGE. The protein band recognized by 3EG antibody and corresponding to β -tubulins was digested with AspN endoprotease. Peptides generated upon proteolysis were analyzed by mass spectrometry as described in Materials and Methods. We identified β 1-, β 2A/B-, and β 3-tubulin isotypes in the mouse neonate brain, as previously observed in the rat neonate brain (Redeker, 2010). We detected the full-length C-termini of these three β -tubulin isotypes, predominantly nonglutamylated, but also monoglutamylated (β 1, β 2A/B, and β 3) and biglutamylated (β 2A/B and β 3). By using a database of all possible truncated tubulin forms, we unambiguously identified a C-terminal peptide of the β2A/B-tubulin missing the four last amino acids, –EDEA (Figure 4D), named $\beta\Delta4$ -tubulin, which terminates with –EEEG residues and presents the epitope recognized by the 3EG antibody. This peptide was predominantly nonglutamylated, but a low-abundance monoglutamylated form was also identified by mass spectrometry. No other truncated C-terminal peptide of β-tubulin was detected.

We then used 3EG antibody in immunofluorescence experiments with cells that solely had the 3EG-reactive $\beta\Delta4$ -tubulin, such as astrocytes, fibroblasts, or HeLa cells, and observed that microtubule arrangements found in mitotic spindles and midbodies are clearly stained by the 3EG antibody (Figure 5A and Supplemental Figure S5). Because we clearly observed labeling in these specific microtubules structures, we investigated whether the cell cycle could regulate the level of C-terminally truncated β variants. However, HeLa cells synchronized in either G1/S or mitosis showed no 3EG labeling difference in Western blot experiments (Figure 5B),

proving that the $\beta\Delta$ 4-tubulin level is stable throughout the cell cycle.

Because the quantity of $\beta\Delta4$ -tubulin is not modified in HEK293T cells overexpressing CCPs (Figure 5C), these enzymes are most probably not involved in the production of the shortened β -tubulin variant.

Taken together, our data demonstrate for the first time the presence of a C-terminally truncated variant of β -tubulin ubiquitously distributed in cells and tissues (Figures 2A and 4A). This new form of tubulin is attributed to the β 2A/B-tubulin isotypes and named β \Delta4-tubulin.

Properties of the new truncated variants of tubulin in neurons

We examined the endogenous tubulin variants by immunofluorescence in cultured hippocampal neurons (2 DIV). Figure 6A illustrates that the 3EG immunoreactivity for both $\alpha\Delta 3$ - and $\beta\Delta 4$ -tubulin is present in the whole neuron. Moreover, we observe a strong correlation of 3EG immunoreactivity with α Tyr staining but not with α deTyr and $\alpha\Delta 2$ staining (Supplemental Figure S6, A [growth cone magnification] and B [quantification of modified-to-total α -tubulin ratio in the axon shaft and the growth cone]; this ratio changed between the axon and the

growth cone when considering α deTyr- and α \Delta2-tubulins, but not when considering α \Delta3- or α Tyr-tubulins]). To assay the relationship between new tubulin variants and microtubule stability, we analyzed resistance to nocodazole of microtubules from the growth cone, which contains high levels of labile domains of tyrosinated microtubules, as well as stable domains of detyrosinated microtubules (Baas *et al.*, 1993; Brown *et al.*, 1993). The ratio of each tubulin variant signal to total α -tubulin signal was measured over time after nocodazole treatment (15 µM). As predicted, nocodazole-resistant microtubules were largely enriched in α deTyr-tubulin over time, whereas their content in α Tyr-tubulin decreased (Figure 6B). Only slight changes in α Δ2 and 3EG (including α Δ3- and β Δ4-tubulin) signals were detected in nocodazole-resistant microtubules. Thus 3EG-positive and α Δ2-positive microtubules seem to have moderate stability in the growth cone of hippocampal neurons.

To distinguish $\alpha\Delta3$ -tubulin and $\beta\Delta4$ -tubulin species, we then examined the endogenous variants by Western blots. Their distribution between soluble and polymer pools was studied in 7 DIV hippocampus neurons in both the absence and presence of nocodazole (Figure 6C). Acetylated-tubulin, a marker of highly stable microtubules, was used as control. In the absence of nocodazole exposure, 97.4% of the signal for acetylated-tubulin was recovered in the microtubular fraction (Figure 6C, left). We found that $\alpha\Delta$ 3tubulin is clearly enriched within the microtubular fraction, like α deTyr-tubulin and $\alpha\Delta$ 2-tubulin (88–92%). Of interest, the new β tubulin variant ($\beta \Delta 4$) was also principally retrieved within the polymer pool (87.7 \pm 2.1%, mean \pm SEM, n = 3). In contrast, only 70% of α Tyr-tubulin was found in the microtubular pool and 30% in the soluble one. On adding 20 μ M nocodazole for 30 min, we observed a significant loss of neuronal microtubules (28%, as estimated from immunoblotting with α tot antibody) and clear changes in α -tubulin species distribution between soluble and microtubular pools

(Figure 6C, right). As predicted, acetylated tubulin was recovered in the microtubular fraction (97.8%). The same fraction contained 96% of the α deTyr-tubulin, 72.5% of the α Δ2-tubulin, 44.2% of the α Δ3-tubulin, and 30% of the α Tyr-tubulin. Thus α Δ3-tubulin behavior under nocodazole treatment is closer to that of labile α Tyr-tubulin than to that of stable α deTyr-tubulin. Of interest, α Δ3-tubulin increases and persists in the soluble pool after drug treatment, suggesting irreversible modification within the cytosol.

To further analyze the relationship between microtubule dynamics and tubulin variants in hippocampal neurons, we performed experiments using paclitaxel. Neuron exposure to the stabilizing drug (15 μ M) for 2 h induces clear changes in the α -tubulin variants: we observed a reduction of tyrosinated tubulin and $\alpha\Delta3$ -tubulin and an accumulation of detyrosinated- and $\alpha\Delta2$ -tubulin (Figure 6D). Thus the shutdown of tubulin dimer turnover between free tubulin and microtubules under paclitaxel exposure induces a loss of $\alpha\Delta3$ -tubulin in cells (see also results in Figure 3E for HEK293T cells expressing CCP1).

Taken together, our results show that $\alpha\Delta3$ -tubulin and $\beta\Delta4$ -tubulin are essentially found in the microtubular pool of neurons. They strongly suggest that microtubular dynamics is required for $\alpha\Delta3$ -tubulin generation and/or maintenance.

DISCUSSION

In the present study, we developed a novel antibody highly specific to C-terminal –EEEG of proteins, which we named 3EG. This antibody detected two proteins among all mouse tissues and cells tested. We demonstrated that these proteins are novel C-terminally truncated variants of α - and β -tubulins.

In the neonate mouse brain, the most abundant of these two proteins reacting with 3EG corresponds to α 1A/B-tubulin missing its last three amino acids. This truncated variant, named $\alpha\Delta$ 3-tubulin, was previously suspected to exist (Berezniuk et al., 2012) because CCP1 produced in insect cells is able to generate it in vitro from purified porcine brain tubulin. Our work demonstrated for the first time the physiological existence of $\alpha \Delta 3$ -tubulin, its restricted presence in neuronal cells, and its enrichment in the brain around birth. It has been shown that in the adult rat brain, α 1A/B-tubulin isotypes constitute ~85% of the α -tubulin subunit pool (of which 30% are tyrosinated and 70% are nontyrosinated), whereas isotype α 4A represents 15% (predominantly nontyrosinated; Redeker, 2010). In neonates, however, only α 1A/B tubulins were detected (Redeker, 2010). When truncated of three (α 1A/B) or two (α 4A) amino acids (Figure 1C), these brain α -tubulin isotypes all react with 3EG. The α 1A- and α 1B-tubulins are the only isoforms present in the neonate brain and are the source of $\alpha \Delta 3$ -tubulin at this stage. They might also be the tubulin isotypes having this modification in adult brains, even if a truncation of α 4A cannot be excluded. Of interest, a Δ 5 form of α -tubulin ending with the -EEEG C-terminal sequence was clearly revealed by mass spectrometry in Toxoplasma gondii (Xiao et al., 2010). We tested the ability of the enzymes of the CCP family to produce $\alpha \Delta 3$ -tubulin and $\alpha \Delta 2$ -tubulin from mCherry- $\alpha 1B$ -tubulin fusion protein; the results are summarized in Figure 3E. They are in agreement with recent data showing that CCP1 and CCP5 purified from sf9-infected cells can catalyze the formation of $\alpha\Delta$ 3-tubulin (Berezniuk et al., 2013). In addition, we show that CCP4 and CCP6 are also able to cleave $\alpha\Delta 2$ -tubulin to generate $\alpha\Delta 3$ -tubulin and that CCP2 and CCP3 seem unable to catalyze this reaction. Our results are discrepant with those of Berezniuk et al. (2013) concerning the effect of CCP5 on the C-terminus of α -tubulin. Indeed, we clearly show here that CCP5 is not able to form $\alpha\Delta 2$ -tubulin from detyrosinated tubulin, whereas they concluded that this enzyme is able to

process the concerned glutamate residue. The most probable explanation of this discrepancy relates to the tubulin isotype studied. Their observation was made on the α 4A-tubulin isotype, whereas our results were obtained with α 1B-tubulin (fused to mCherry). Therefore we give here the first indication that CCP deglutamylases (in the present case, CCP5) might be selective of the α -tubulin isotype for their activity on the primary chain of the protein. This might also be the case regarding CCP activity on glutamate side chains.

The second protein reacting with 3EG antibody was identified as a novel C-terminally truncated β -tubulin, as shown by both immunoprecipitation experiments and mass spectrometry analysis. Within neonate brains (in which β -tubulin is less polyglutamylated and thus easier to analyze), we identified a truncated form of β 2A/B-tubulin that ends with -EEEG and results from the cleavage of the last four amino acids, -EDEA, from the full-length protein encoded by its gene. The β 2A/B-tubulin isotypes were found in several tissues and represent the predominant isotypes in the nervous system, where they are expressed in both neurons and glia (Luduena, 2013). The newly discovered variant, named $\beta\Delta4$ -tubulin, is present in all mouse tissues and cells tested at low level (similar to $\alpha\Delta3$ -tubulin, as observed from the intensity of both band signals obtained with 3EG antibody; Figures 2A and 4A). Although $\beta\Delta4$ -tubulin can be clearly observed by immunofluorescence when concentrated in mitotic spindles or midbodies, its level does not vary during the cell cycle. Because microtubules are bundling in such mitotic arrangements, we cannot distinguish between a specific or nonspecific enrichment of the new truncated tubulin variant in these structures.

Although truncation of the α -tubulin C-terminus was discovered some time ago and, since then, detyrosination/tyrosination of α tubulin has been shown to play a vital role (Erck et al., 2005), very few studies have described truncations in the C-terminal region of β tubulins. To our knowledge, the work by Miller et al. (2008) is the only one describing truncated β -tubulin in mammals. They found evidence for the removal of the C-terminal alanine and the penultimate value residues from β 2C-tubulin in rat liver tissue (Miller *et al.*, 2008). β -Tubulin truncation was also observed in sea urchin. Indeed, a large amount (20%) of the β -tubulin from sea urchin sperm flagellar axonemes unexpectedly lacks the three carboxy-terminal residues -EAA encoded by its gene (Multigner et al., 1996). Thus glutamate and aspartate, but also alanine and valine, residues appear to be cleaved from proteins encoded by β -tubulin genes. Carboxypeptidases capable of cleaving acidic residues, deglutamylases and deaspartylases, were recently discovered (Rogowski et al., 2010; Tort et al., 2014). Physiological substrates for deglutamylases, such as lateral chains of glutamates on tubulins and other proteins, and Ctermini of α -tubulins have long been known. Our data indicate the first physiological substrate for deaspartylases: mammalian β2A/Btubulin isotypes. The newly identified truncated variant of β -tubulin strongly argues for the existence of other enzymes allowing an increasing range of carboxy-terminal processing. In particular, because all of the processed β -tubulins end with an alanine (Multigner et al., 1996; Miller et al., 2008), dealaninases should very probably exist.

By the use of specific antibodies and a series of mCherry– α tubulin isotypes as standards, we estimated the distribution of the diverse α -tubulin variants, α Tyr, α deTyr, $\alpha\Delta 2$, and $\alpha\Delta 3$, in the neonate and adult mouse brain (Figure 2G). For the already known variants (α Tyr, α deTyr, and $\alpha\Delta 2$), our data for adult mouse brain are in good agreement with the data obtained by mass spectrometry using rat brains (Redeker *et al.*, 1998) and by a separation method using the bovine brain (Paturle *et al.*, 1989). In addition, our analyses show that the $\alpha\Delta 3$ neuronal variant represents only a small portion (~1%) of the total amount of α -tubulin present in the neonate and adult brain. It may thus be involved in very specific function(s) of the neuronal microtubules.

Surprisingly, the total amount of α -tubulin found in adults when adding all species corresponds to only 41% of the total amount of $\alpha\text{-tubulin}$ found in neonates. Indeed, we observed a decrease of all variants of α -tubulin except $\alpha \Delta 2$ between neonate and adult tissue: tyrosinated tubulin decreases sevenfold, detyrosinated tubulin by 30%, and $\alpha\Delta3$ by threefold, whereas $\alpha\Delta2$ -tubulin increases about sixfold. Two explanations can be considered to explain these results. First, some modification might occur in the adult brain (such as lateral polyglutamylation) that disturbs the binding of the α -tubulin Cterminus antibodies used in the present study (anti-tyrosinated, -detyrosinated, $-\Delta 2$, $-\Delta 3$). In such a case, however, it would be surprising that the level of $\alpha\Delta 2$ would still increase as much as six times between neonate and adult tissues (Figure 2G). This is also unlikely because α -tubulin is already very glutamylated in neonate brains (Redeker, 2010) and we showed that polyglutamylation does not alter 3EG antibody binding to tubulin (Figure 2H). Thus the second, likelier explanation is that other unknown modification(s) of the α -tubulin C-terminus might occur in the adult brain and regulate C-terminal truncation.

The discovery of two novel C-terminally truncated variants of tubulins and, remarkably a truncated form of β -tubulin increases their diversity. These variants of α - and β -tubulins, which end with the same amino acids sequence, -EEEG, could share a common specific physiological significance. In neurons, $\alpha\Delta$ 3-tubulin and $\beta\Delta$ 4-tubulin are essentially found in the microtubular pool. Of interest, $\alpha\Delta 3$ tubulin is present on neuronal microtubules sharing properties with tyrosinated microtubules and not with microtubules bearing the other truncated α -tubulin species or the acetylated tubulin. Hence the neuronal microtubule network appears to be more heterogeneous in composition and turnover rate than previously described, when only tyrosinated and detyrosinated tubulins were known (Schulze et al., 1987; Webster et al., 1987). Although corresponding to a modified tubulin, the $\alpha \Delta 3$ species seems to be related to dynamic microtubules. Microtubule turnover appears to be required for its generation and/or maintenance, in contrast to $\alpha\Delta 2$ -tubulin formation, which requires stable microtubules. To explain these properties, we can speculate that whereas $\alpha\Delta 2$ -tubulin may be generated by CCP enzymes on microtubules, the $\alpha \Delta 3$ variant may be formed by these enzymes in the cytosol. It is of interest that levels of $\alpha\Delta$ 3-tubulin change with brain age, and it is mainly present before and around birth. Thus the $\alpha\Delta$ 3-tubulin species could have critical function(s) for neuronal development, most probably related to highly dynamic microtubules. The new $\alpha\Delta$ 3-variant could also confer specific properties on neuronal microtubules due to interaction with specific partners.

Deciphering precisely the function(s) of the new physiological $\alpha\Delta 3$ - and $\beta\Delta 4$ -tubulin forms will be of crucial importance. This is also the case for the abundant neuronal $\alpha\Delta 2$ -tubulin (Paturle-Lafanechere *et al.*, 1991, 1994), for which specific functions remain to be identified.

MATERIALS AND METHODS

Mouse experiments

In compliance with the European Community Council Directive of November 24, 1986 (86/609/EEC), research involving animals was authorized by the Direction Départementale de la Protection des Populations, Préfecture de l'Isère, France (Permit 380711). Every effort was made to minimize the number of animals used and their suffering. This study was approved by the local ethics committee of the Grenoble Institut des Neurosciences. For tissue preparation or cell culture, mice were killed and organs were quickly dissected.

Cell culturing

Hippocampal neurons and murine embryonic fibroblasts (MEFs) were prepared as previously described (Erck *et al.*, 2005). Astrocytes and cortical neurons were obtained from cerebral cortices of 18-d mouse fetuses and MEFs from 13-d mouse fetuses. Adherent HEK293T cells were maintained under standard conditions.

For the synchronization protocol, HeLa Kyoto cells were cultured in DMEM supplemented with 10% fetal bovine serum. Cells were nonsynchronized, synchronized in G1/S using double-thymidine block (2 mM), or synchronized in mitosis using either double-thymidine block released for 9 h or nocodazole block (100 ng/ml) released for 30 min. Mitotic cells were collected after release by mitotic shake-off. Cell extracts were obtained after lysis with buffer containing 50 mM 4-(2-hydroxyethyl)-1-piperazineethanesulfonic acid (pH 7.5), 150 mM NaCl, 1.5 mM MgCl₂, 1 mM ethylene glycol tetraacetic acid (EGTA), 1% IGEPAL CA-630, and protease inhibitors (Sigma-Aldrich, Taukkirchen, Germany). Protein concentration for lysate was determined using Bradford reagent (Sigma-Aldrich).

Antibodies

Primary antibodies used in this study are presented in Supplemental Table S2. The novel antibody (3EG) was produced in rabbits by using peptide C-GEGEEEG (α 1A/B-tubulin C-terminus missing three amino acids) linked at its N-terminus to the keyhole limpet hemocyanin protein via the cysteine. The peptide C-terminus ends with COOH. Anti-rabbit, anti-mouse, and anti-guinea pig secondary antibodies tagged with either cyanine-5 or cyanine-3 were from Jackson ImmunoResearch (Newmarket, United Kingdom), and anti-rabbit, anti-mouse, and anti-guinea pig secondary antibodies tagged with horseradish peroxidase (HRP) were from Macherey Nagel (Hoerdt, France). Mouse TrueBlot ULTRA (anti-mouse immunoglobulin G–HRP) was from eBioscience (Paris, France).

Expression constructs and cell transfection

The GFP-CCP expression constructs used in the present study were described previously (Peris *et al.*, 2009; Rogowski *et al.*, 2010; Tort *et al.*, 2014). The α -tubulin variant constructs were generated by introducing mutations with PCR amplifications between the *Psh*Al and *Bam*HI restriction sites of α -tubulin cDNA (mouse α 1A-tubulin tagged with mCherry; Supplemental Table S3). The various PCR products were cloned into templates by using the In-Fusion HD Cloning Kit (Ozyme, Montigny, France). All constructs were verified by sequence analysis.

Adherent HEK293T cells were transfected with jetPEI transfection reagent (Polyplus-Transfection, Illkirch, France). For cotransfections of mCherry– α -tubulin with CCPs (Figure 3 and Supplemental Figure S3), a 2:1 ratio was used. Murine embryonic fibroblasts were transfected using Amaxa Nucleofector kits (Lonza, Basel, Zwitzerland).

Western blotting

For Western blotting, cells were collected after 24 h of transfection when transfecting one plasmid and after 48 h when transfecting two plasmids. After washing with phosphate-buffered saline (PBS) medium at 37°C, cells were directly lysed in Laemmli buffer. Crude protein extracts from tissues were obtained by extraction in 100 mM 1,4-piperazinediethanesulfonic acid at pH 6.7, 1 mM EGTA, 1 mM MgCl₂, and protease inhibitors (Complete Mini EDTA-free; Roche Diagnostics, Meylan, France) using a FastPrep Instrument (MP Biomedicals, Illkirch, France). Cell remnants were eliminated by 10 min of centrifugation at 10,000 × g, and Laemmli buffer was added. Proteins were resolved on 10% SDS–PAGE, followed by electrotransfer onto Immobilon P sheets (Millipore, St Quentin en Yvelines, France). Two commercial SDS preparations were used (Sigma-Aldrich L5750 and L4509), with the less pure one allowing clear separation of α - and β -tubulins, as previously observed (Best et al., 1981). Primary antibodies (Supplemental Table S2) were incubated, and the blots were then stained with secondary antibodies coupled to HRP (1:5000), followed by detection by chemiluminescence (ECL Western blot Detection Kit; GE Healthcare, Velizy, France). The reactive proteins were detected and analyzed using the ChemiDoc MP System (Bio-Rad, Dusseldorf, Germany).

For analysis and graphical representations (Figure 2, E and G, and Supplemental Table S1), protein bands from immunoblots were quantified using ImageJ software (National Institutes of Health, Bethesda, MD). After subtraction of the background, relative detection levels for modification-specific antibodies were determined by adjusting the values to total tubulin levels (measured with α tot antibody). To determine the status of modifications in the brain (Figure 2G), tissues and HEK293T cells expressing each modified mCherry- α tubulin were coanalyzed (in the same immunoblots; Supplemental Figure S2). This allowed us to determine the sensitivity of each modification-specific antibody in the experiment, which is the ratio of signal with modification-specific antibody to signal α tot obtained with the corresponding modified mCherry- α tubulin. Then signals obtained with tissues extracts were normalized to total α tubulin levels (α tot immunoblot of tissues) and to antibody sensitivity in the experiment. We postulated that the sum of the four analyzed modifications (α Tyr, α deTyr, $\alpha\Delta 2$, and $\alpha\Delta3$) represents 100% of α -tubulin in the neonate brain and used bar diagrams to plot results as percentages.

Immunocytochemistry

For immunofluorescence, fibroblasts were fixed at 37°C in 4% paraformaldehyde/4.2% sucrose/PBS, followed by permeabilization in 0.1% Triton X-100/PBS. Neurons were fixed at 37°C in 4% paraformaldehyde, 4% sucrose, 0.25% glutaraldehyde, and 0.1% Triton X-100 and incubated in NaBH₄/PBS quenching solution. Cells were then incubated with primary antibodies (Supplemental Table S2), followed by incubation with secondary antibodies conjugated with either cyanine-3 or cyanine-5 fluorophores (1:700–1:1000). Nuclei were stained using Hoescht 33258 (1 μ g/ml).

Immunofluorescence analysis

When analyzing immunocytochemistry experiments (Figure 3D), cells were segmented using anti-tyrosinated antibody (YL_{1/2}) signal with ImageJ software (Schneider *et al.*, 2012). Cells were classified as GFP positive (mean intensity of 8.8 ± 2.1 and 12.3 ± 2.3, respectively, for CCP1 and CCP5) or GFP negative (mean intensity of 1 ± 0.3). The $\alpha\Delta$ 3-tubulin content was then expressed as the mean intensity staining for 3EG antibody.

When analyzing neuronal microtubule susceptibility to nocodazole (Figure 6B), the microtubule network was quantified as mean fluorescence intensity measured on lines of 5–15 µm long placed within growth cone of each neuron. In the three conditions (0, 15, and 30 min of nocodazole), 31–60 neurons were analyzed for α Tyr and $\alpha\Delta 2$ and 49–61 neurons were analyzed for α deTyr and 3EG. Microtubule fluorescence signal for each variant, *F*(variant), was normalized to α tot signal measured in the same region, *F*(α tot), which is an index of the remaining microtubules), and then was plotted (mean ± SEM) as percentage of the value obtained in the absence of nocodazole.

Immunoprecipitation

Lysates of HEK293T cells were obtained by extraction in 50 mM Tris, pH 8.0, 150 mM NaCl, 1 mM MgCl₂, and 20 μ g/ml DNase plus protease inhibitors (Complete Mini EDTA-free, Roche Diagnostics, Meylan, France) and 1% NP-40. In the case of neonate brains, soluble proteins were first extracted in the same medium without detergent using a FastPrep apparatus (MP Biomedicals), followed by centrifugation. NP-40 (1%) was added to supernatant containing the brain soluble proteins for immunoprecipitation. Lysates were incubated 2 h at 4°C with either anti– α -tubulin (α tot) or anti- β -tubulin (β tot) antibodies, followed by 1 h of incubation at 4°C with protein G–Sepharose beads (GE Healthcare). Immunoprecipitates were then washed three times with 50 mM Tris, pH 8.0, 150 mM NaCl, and 0.2% NP-40 and directly added to Laemmli solution for analysis. Analyses of the controls (α tot and β tot Western blots) were performed using mouse TrueBlot ULTRA.

Mass spectrometry

Sample preparation. The α - and β -tubulins purified from neonate brain by a cycle of microtubule assembly and disassembly were separated on 10% SDS–PAGE. Protein bands corresponding to β -tubulins were excised and subjected to in-gel proteolytic digestion and proteolytic peptide extraction using the Progest robot (Genomic Solutions, Chemsford, MA). Briefly, bands were extensively washed with acetonitrile and 25 mM NH₄HCO₃ and treated with 10 mM dithiothreitol (30 min at 56°C) and then 55 mM iodoacetamide (30 min at room temperature). Gel slices were then dried and incubated with endoproteinase Asp-N (5 ng/µl; Roche Diagnostics) for 6 h at 37°C. Proteolytic peptides were extracted (using 60% acetonitrile/0.1% formic acid solution, followed by pure acetonitrile), vacuum dried, and resuspended in 5% acetonitrile and 0.1% trifluoroacetic acid before mass spectrometry analysis.

Nano-liquid chromatography/tandem mass spectrometry analysis. Nano-liquid chromatography/tandem mass spectrometry (nanoLC-MS/MS) analyses were performed with the LTQ Orbitrap Velos mass spectrometer (Thermo Scientific) coupled to the EASY nLC II high-performance liquid chromatography system (Proxeon, Thermo Scientific, Waltham, MA). Peptide separation was performed on a reverse-phase C18 column (100-µm inner diameter, 5-µm C18 particles, 15-cm length, NTCC-360/100-5) from Nikkyo Technos (Tokyo, Japan) with a 5–35% solvent B gradient over 40 min. Solvent A was 0.1% formic acid in water, and solvent B was 0.1% formic acid in 100% acetonitrile. NanoLC-MS/MS experiments were conducted in data-dependent acquisition mode. The 20 most intense ionsabove an intensity threshold of 2000 counts—were selected for CID fragmentation and analysis in the LTQ. The m/z values of the precursor peptide ions were measured with a high resolution of 60,000 in the Orbitrap.

Data analysis. NanoLC-MS/MS data were analyzed in two steps. First, data were processed automatically using the Mascot search engine (version 2.4.1; Matrix Science, London, United Kingdom) in Proteome Discoverer 1.4 against the Swissprot database (release 2014_08), with carbamidomethylation of cysteines as fixed modification and oxidation of methionines and glutamylation of glutamates as variable modifications. Second, a targeted search was conducted against a database composed of all β-tubulin isotypes and all possible C-terminal truncated β-tubulin sequences, with the same modifications as the first search. Peptide and fragment tolerance were respectively set at 10 ppm and 0.6 Da.

ACKNOWLEDGMENTS

We thank Charlotte Corrao and Irene Perez Diez for technical assistance and the zoo technicians for animal care. We are grateful to Jean-Christophe Deloulme for excellent guidance and experimental support on brain dissections and Didier Job for initiation of the project and instructive discussions. We thank Bénédicte Delaval and Anne Fourest-Lieuvin for constructive comments on the manuscript. This work was supported by Association pour la Recherche sur le Cancer Grant SFI20111204053 (M.J.M.) and La Ligue contre le Cancer comité de Savoie (M.J.M.).

REFERENCES

- Alexander JE, Hunt DF, Lee MK, Shabanowitz J, Michel H, Berlin SC, MacDonald TL, Sundberg RJ, Rebhun LI, Frankfurter A (1991). Characterization of posttranslational modifications in neuron-specific class III beta-tubulin by mass spectrometry. Proc Natl Acad Sci USA 88, 4685–4689.
- Audebert S, Desbruyeres E, Gruszczynski C, Koulakoff A, Gros F, Denoulet P, Edde B (1993). Reversible polyglutamylation of alpha- and beta-tubulin and microtubule dynamics in mouse brain neurons. Mol Biol Cell 4, 615–626.
- Baas PW, Ahmad FJ, Pienkowski TP, Brown A, Black MM (1993). Sites of microtubule stabilization for the axon. J Neurosci 13, 2177–2185.
- Badin-Larcon AC, Boscheron C, Soleilhac JM, Piel M, Mann C, Denarier E, Fourest-Lieuvin A, Lafanechere L, Bornens M, Job D (2004). Suppression of nuclear oscillations in Saccharomyces cerevisiae expressing Glu tubulin. Proc Natl Acad Sci USA 101, 5577–5582.
- Berezniuk I, Lyons PJ, Sironi JJ, Xiao H, Setou M, Angeletti RH, Ikegami K, Fricker LD (2013). Cytosolic carboxypeptidase 5 removes alpha- and gamma-linked glutamates from tubulin. J Biol Chem 288, 30445–30453.
- Berezniuk I, Vu HT, Lyons PJ, Sironi JJ, Xiao H, Burd B, Setou M, Angeletti RH, Ikegami K, Fricker LD (2012). Cytosolic carboxypeptidase 1 is involved in processing alpha- and beta-tubulin. J Biol Chem 287, 6503–6517.
- Best D, Warr PJ, Gull K (1981). Influence of the composition of commercial sodium dodecyl sulfate preparations on the separation of alpha- and beta-tubulin during polyacrylamide gel electrophoresis. Anal Biochem 114, 281–284.
- Bieling P, Kandels-Lewis S, Telley IA, van Dijk J, Janke C, Surrey T (2008). CLIP-170 tracks growing microtubule ends by dynamically recognizing composite EB1/tubulin-binding sites. J Cell Biol 183, 1223–1233.
- Brown A, Li Y, Slaughter T, Black MM (1993). Composite microtubules of the axon: quantitative analysis of tyrosinated and acetylated tubulin along individual axonal microtubules. J Cell Sci 104, 339–352.
- Cai D, McEwen DP, Martens JR, Meyhofer E, Verhey KJ (2009). Single molecule imaging reveals differences in microtubule track selection between Kinesin motors. PLoS Biol 7, e1000216.
- Contin MA, Arce CA (2000). Tubulin carboxypeptidase/microtubules association can be detected in the distal region of neural processes. Neurochem Res 25, 27–36.
- Dunn S, Morrison EE, Liverpool TB, Molina-Paris C, Cross RA, Alonso MC, Peckham M (2008). Differential trafficking of Kif5c on tyrosinated and detyrosinated microtubules in live cells. J Cell Sci 121, 1085–1095.
- Edde B, Rossier J, Le Caer JP, Desbruyeres E, Gros F, Denoulet P (1990). Posttranslational glutamylation of alpha-tubulin. Science 247, 83–85.
- Erck C, Peris L, Andrieux A, Meissirel C, Gruber AD, Vernet M, Schweitzer A, Saoudi Y, Pointu H, Bosc C, et al. (2005). A vital role of tubulintyrosine-ligase for neuronal organization. Proc Natl Acad Sci USA 102, 7853–7858.
- Ersfeld K, Wehland J, Plessmann U, Dodemont H, Gerke V, Weber K (1993). Characterization of the tubulin-tyrosine ligase. J Cell Biol 120, 725–732.
- Giraudel A, Lafanechere L, Ronjat M, Wehland J, Garel JR, Wilson L, Job D (1998). Separation of tubulin subunits under nondenaturing conditions. Biochemistry 37, 8724–8734.
- Janke C, Bulinski JC (2011). Post-translational regulation of the microtubule cytoskeleton: mechanisms and functions. Nat Rev Mol Cell Biol 12, 773–786.
- Janke C, Rogowski K, Wloga D, Regnard C, Kajava AV, Strub JM, Temurak N, van Dijk J, Boucher D, van Dorsselaer A, et al. (2005). Tubulin polyglutamylase enzymes are members of the TTL domain protein family. Science 308, 1758–1762.

- Kaul N, Soppina V, Verhey KJ (2014). Effects of alpha-tubulin K40 acetylation and detyrosination on kinesin-1 motility in a purified system. Biophys J 106, 2636–2643.
- Lacroix B, van Dijk J, Gold ND, Guizetti J, Aldrian-Herrada G, Rogowski K, Gerlich DW, Janke C (2010). Tubulin polyglutamylation stimulates spastin-mediated microtubule severing. J Cell Biol 189, 945–954.
- Lafanechere L, Courtay-Cahen C, Kawakami T, Jacrot M, Rudiger M, Wehland J, Job D, Margolis RL (1998). Suppression of tubulin tyrosine ligase during tumor growth. J Cell Sci 111, 171–181.
- Lafanechere L, Job D (2000). The third tubulin pool. Neurochem Res 25, 11–18.
- Liao G, Gundersen GG (1998). Kinesin is a candidate for cross-bridging microtubules and intermediate filaments. Selective binding of kinesin to detyrosinated tubulin and vimentin. J Biol Chem 273, 9797–9803.
- Luduena RF (2013). A hypothesis on the origin and evolution of tubulin. Int Rev Cell Mol Biol 302, 41–185.
- Mary J, Redeker V, Le Caer JP, Prome JC, Rossier J (1994). Class I and IVa beta-tubulin isotypes expressed in adult mouse brain are glutamylated. FEBS Lett 353, 89–94.
- Miller LM, Menthena A, Chatterjee C, Verdier-Pinard P, Novikoff PM, Horwitz SB, Angeletti RH (2008). Increased levels of a unique post-translationally modified betaIVb-tubulin isotype in liver cancer. Biochemistry 47, 7572–7582.
- Moutin MJ, Andrieux A, Janke C (2011). Microtubule polyglutamylation and neurodegeneration [in French]. Med Sci (Paris) 27, 464–467.
- Multigner L, Pignot-Paintrand I, Saoudi Y, Job D, Plessmann U, Rudiger M, Weber K (1996). The A and B tubules of the outer doublets of sea urchin sperm axonemes are composed of different tubulin variants. Biochemistry 35, 10862–10871.
- Paturle L, Wehland J, Margolis RL, Job D (1989). Complete separation of tyrosinated, detyrosinated, and nontyrosinatable brain tubulin subpopulations using affinity chromatography. Biochemistry 28, 2698–2704.
- Paturle-Lafanechere L, Edde B, Denoulet P, Van Dorsselaer A, Mazarguil H, Le Caer JP, Wehland J, Job D (1991). Characterization of a major brain tubulin variant which cannot be tyrosinated. Biochemistry 30, 10523–10528.
- Paturle-Lafanechere L, Manier M, Trigault N, Pirollet F, Mazarguil H, Job D (1994). Accumulation of delta 2-tubulin, a major tubulin variant that cannot be tyrosinated, in neuronal tissues and in stable microtubule assemblies. J Cell Sci 107, 1529–1543.
- Peris L, Thery M, Faure J, Saoudi Y, Lafanechere L, Chilton JK, Gordon-Weeks P, Galjart N, Bornens M, Wordeman L, et al. (2006). Tubulin tyrosination is a major factor affecting the recruitment of CAP-Gly proteins at microtubule plus ends. J Cell Biol 174, 839–849.
- Peris L, Wagenbach M, Lafanechere L, Brocard J, Moore AT, Kozielski F, Job D, Wordeman L, Andrieux A (2009). Motor-dependent microtubule disassembly driven by tubulin tyrosination. J Cell Biol 185, 1159–1166.
- Redeker V (2010). Mass spectrometry analysis of C-terminal posttranslational modifications of tubulins. Methods Cell Biol 95, 77–103.
- Redeker V, Melki R, Prome D, Le Caer JP, Rossier J (1992). Structure of tubulin C-terminal domain obtained by subtilisin treatment. The major alpha and beta tubulin isotypes from pig brain are glutamylated. FEBS Lett 313, 185–192.
- Redeker V, Rossier J, Frankfurter A (1998). Posttranslational modifications of the C-terminus of alpha-tubulin in adult rat brain: alpha 4 is glutamylated at two residues. Biochemistry 37, 14838–14844.
- Redeker V, Rusconi F, Mary J, Prome D, Rossier J (1996). Structure of the C-terminal tail of alpha-tubulin: increase of heterogeneity from newborn to adult. J Neurochem 67, 2104–2114.
- Rogowski K, van Dijk J, Magiera MM, Bosc C, Deloulme JC, Bosson A, Peris L, Gold ND, Lacroix B, Grau MB, et al. (2010). A family of proteindeglutamylating enzymes associated with neurodegeneration. Cell 143, 564–578.
- Rudiger M, Plessman U, Kloppel KD, Wehland J, Weber K (1992). Class Il tubulin, the major brain beta tubulin isotype is polyglutamylated on glutamic acid residue 435. FEBS Lett 308, 101–105.
- Rudiger A, Rudiger M, Weber K, Schomburg D (1995). Characterization of post-translational modifications of brain tubulin by matrix-assisted laser desorption/ionization mass spectrometry: direct one-step analysis of a limited subtilisin digest. Anal Biochem 224, 532–537.
- Schneider CA, Rasband WS, Eliceiri KW (2012). NIH Image to ImageJ: 25 years of image analysis. Nat Methods 9, 671–675.
- Schulze E, Asai DJ, Bulinski JC, Kirschner M (1987). Posttranslational modification and microtubule stability. J Cell Biol 105, 2167–2177.

- Sirajuddin M, Rice LM, Vale RD (2014). Regulation of microtubule motors by tubulin isotypes and post-translational modifications. Nat Cell Biol 16, 335–344.
- Tort O, Tanco S, Rocha C, Bieche I, Seixas C, Bosc C, Andrieux A, Moutin MJ, Xavier Aviles F, Lorenzo J, Janke C (2014). The cytosolic carboxypeptidases CCP2 and CCP3 catalyze posttranslational removal of acidic amino acids. Mol Biol Cell 25, 3017–3027.
- van Dijk J, Rogowski K, Miro J, Lacroix B, Edde B, Janke C (2007). A targeted multienzyme mechanism for selective microtubule polyglutamylation. Mol Cell 26, 437–448.
- Vogel P, Hansen G, Fontenot G, Read R (2010). Tubulin tyrosine ligase-like 1 deficiency results in chronic rhinosinusitis and abnormal development of spermatid flagella in mice. Vet Pathol 47, 703–712.

Webster DR, Gundersen GG, Bulinski JC, Borisy GG (1987). Assembly and turnover of detyrosinated tubulin in vivo. J Cell Biol 105, 265–276.

- Wehland J, Weber K (1987). Turnover of the carboxy-terminal tyrosine of alpha-tubulin and means of reaching elevated levels of detyrosination in living cells. J Cell Sci 88, 185–203.
- Wehland J, Willingham MC (1983). A rat monoclonal antibody reacting specifically with the tyrosylated form of alpha-tubulin. II. Effects on cell movement, organization of microtubules, and intermediate filaments, and arrangement of Golgi elements. J Cell Biol 97, 1476–1490.
- Xiao H, El Bissati K, Verdier-Pinard P, Burd B, Zhang H, Kim K, Fiser A, Angeletti RH, Weiss LM (2010). Post-translational modifications to Toxoplasma gondii alpha- and beta-tubulins include novel C-terminal methylation. J Proteome Res 9, 359–372.

SUPPLEMENTAL MATERIAL

Supplemental figure legends.

Figure S1. $\alpha\Delta3$ -tubulin is present in all regions of adult mouse brain. Equal quantities of proteins extracted from various regions of neonate mouse brain were subjected to immunoblot for analysis of $\alpha\Delta3$ -tubulin presence (with 3EG antibody). Protein levels were controlled using α tot antibody.

Figure S2. Immunoblots for quantitative analysis of α -tubulin variants in mouse brain. Proteins extracts from neonate and adult mice brains were co-analyzed with extracts from HEK293T cells transfected with mCherry- α -tubulin variants, including tyrosinated, detyrosinated, $\alpha\Delta 2$ and $\alpha\Delta 3$. α tot antibody was used to control loading of cell extracts and mCherry tubulin variant (95kD) expression levels.

Figure S3. Cleavage of mCherry-αdeTyr-tubulin by CCP1 and CCP5 enzymes. Immunoblots of protein extracts from HEK293T cells co-expressing mCherry-αdeTyr-tubulin and the CCP enzymes. αtot antibody was used to control the expression level of mCherry-αdeTyr-tubulin (95kD) in cells. mCherry tubulin variants produced from the detyrosinated form were analyzed.

Figure S4. Presence of the lower band stained by 3EG in purified tubulin preparations. Immunoblot of tubulin purified from adult and neonate brains and the corresponding Coomassie-stained gel (bottom). Tubulin monomers are indicated by arrows. Tubulin preparation was performed by tissue homogeneisation in 100 mM Pipes, 1 mM MgCl₂, 1 mM EGTA followed by a cycle of microtubule assembly and disassembly.

Figure S5. $\beta \Delta 4$ -tubulin evidenced in fibroblasts. Immunocytochemistry of murine embryonic fibroblasts using 3EG and β tot antibodies.

Supplemental Tables

		Dilut	tions	T	N 11	
Antibody name	Antibody name Antigen or epitope in bl		immuno cyto- chemistry	Туре	Provider	
α tot (α 3a)	Epitope: DMAALE (see figure 1C)	1:5,000		mouse monoclonal	(Erck et al., 2005) Kind gift of L Lafanechère	
β tot (β 3a)	Epitope: EYQQYQ (see figure 4C)	1:10,000	1:1,000	mouse monoclonal	Kind gift of L Lafanechère	
Anti-Tyr tubulin (YL1/2)		1:10,000	1:5,000	rat monoclonal	(Wehland and Willingham, 1983)	
anti-deTyr-tubulin	KLH-CGEEEGEE- COOH*	1:10,000		rabbit polyclonal	our own production, (Paturle-Lafanechere et al., 1994)	
anti-∆2-tubulin	KLH-CEGEEEGE- COOH*	1:10,000		rabbit polyclonal	our own production, (Paturle-Lafanechere et al., 1994)	
3EG (anti- $\alpha\Delta 3$ and β - truncated tubulins)	KLH-CEEGEEEG- COOH*	1:10,000	1:1,000	rabbit polyclonal	see Material and Methods	
anti-GFP	GFP	1:5,000		rabbit polyclonal	Invitrogen	
Anti-mCherry	mCherry		1:1,000	mouse monoclonal	Clontech	
H3-ser10P	Histone H3 (phospho S10)	1:2,500		rabbit polyclonal	Abcam	

Table S1 - Primary antibodies used in this study

*KLH: keyhole limpet hemocyanin

Table S2 - Primers used to mutagenize $\alpha 1B$ tubulin cDNAs fused to mCherry.

Forward primer was GGCCATCTATGACATCTGTCG and reverse primers are listed below. Restriction sites used for the cloning are in bold, substituted nucleotides are underlined, non-coding sequences are in lower case and stop codon is in red.

cDNA	Reverse PCR primer
mCherry α tub	Template plasmid - a1B tubulin cloned into pcDNA3.1-mCherry
	Gift from F. Saudou
mCherry α deTyr	cgcccttcgaggatccttaTTCCTCTCCTCTCCTCACC
mCherry $\alpha \Delta 2$	cgcccttcgaggatccttaCTCTCCTTCTTCCTCCCCCT
mCherry $\alpha \Delta 3$ (GEEEG)	cgcccttcgaggatccttaTCCTTCTTCCTCACCCTCTCC
mCherry $\alpha \Delta 3$ -GEDEG	cgcccttcgaggatccttaTCCTTCACCTCACCCTCTCCAAC
mCherry $\alpha \Delta 3$ -GENEG	cgcccttcgaggatccttaTCCTTCGTTCTCACCCTCTCCTTCAACAG
mCherry $\alpha \Delta 3$ -GAEEG	cgcccttcgaggatccttaTCCTTCTTCAGCACCCTCTCCTTCAACAGAAT
mCherry $\alpha \Delta 3$ -GDDEG	cgcccttcgaggatccttaTCCTTCATCATCACCCTCTCCTTCAACAGAA
mCherry $\alpha \Delta 3$ - <u>A</u> EEEG	cgcccttcgaggatccttaTCCTTCTTCCTCAGCCTCTCCTTCAACAGAATCCA
mCherry $\alpha \Delta 3$ - <u>EEEEG</u>	cgcccttcga ggatcctta TCCTTCTTCCTC <u>TT</u> CCTCTCCTTCAACAGAATCCA

Supplemental references.

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

Paturle-Lafanechere, L., Manier, M., Trigault, N., Pirollet, F., Mazarguil, H., and Job, D. (1994). Accumulation of delta 2-tubulin, a major tubulin variant that cannot be tyrosinated, in neuronal tissues and in stable microtubule assemblies. Journal of cell science *107 (Pt 6)*, 1529-1543.

Wehland, J., and Willingham, M.C. (1983). A rat monoclonal antibody reacting specifically with the tyrosylated form of alpha-tubulin. II. Effects on cell movement, organization of microtubules, and intermediate filaments, and arrangement of Golgi elements. The Journal of cell biology *97*, 1476-1490.



Figure S2





Figure S5



CONCLUSIONS GENERALES

Conclusions générales

Les microtubules sont des éléments clefs du cytosquelette des cellules eucaryotes. Ils sont assemblés par la polymérisation de dimères de tubulines alpha et beta. Malgré leur similitude structurale élémentaire, les microtubules possèdent des fonctions très différentes. Cette diversité de fonctions prend source dans deux mécanismes de diversification des microtubules : dans l'expression et l'incorporation de différentes isoformes de tubulines et par les modifications post-traductionnelles des microtubules. L'expression d'isoformes est une régulation lente nécessitant la transcription, la traduction, le repliement et l'incorporation en microtubules des ces tubulines. Elles semblent avoir un impact sur les propriétés mécaniques et structurales des microtubules. Les modifications post-traductionnelles quant à elles génèrent des changements de propriétés biochimiques rapides, et sont le plus souvent réversibles. Elles régulent ainsi plus finement les fonctions des microtubules en modulant l'affinité d'interaction des microtubules avec leurs partenaires moléculaires.

Le nombre important d'isoformes de tubuline ainsi que la diversité des modifications posttraductionnelles pouvant être générée sur les microtubules soulignent l'importance de ces mécanismes dans leur régulation fonctionnelle. Nos travaux ont en ces points participé à la révélation de la complexité de ces mécanismes. Tout d'abord nous avons révélé un nouveau variant physiologique de la tubuline alpha. Au-delà de la simple mise en évidence de cette forme de tubuline, nos résultats laissent supposer que de nombreux autres variants tronqués pourraient exister. De plus, nous avons montré l'existence d'une tubuline beta tronquée de quatre acides aminés dont la présence est ubiquitaire. Ces résultats compètent le schéma déjà complexe de la diversité de modifications post-traductionnelles des tubulines, et notamment celles des beta tubulines encore aujourd'hui très peu décrites.

Nos travaux participent également à l'étude des enzymes régissant ces nombreuses modifications. La découverte d'une tubuline beta tronquée suggère notamment l'existence ubiquitaire soit d'endopeptidase clivant entre une glycine et un glutamate, soit de carboxypeptidases capables de « dé-alaniner » la tubuline encore non-identifiées. De plus, nous avons identifié deux nouvelles enzymes, les Tubuline CarboxyPeptidases, jusque là nommées les vasohibine-1 et vasohibine-2. Enfin, concernant les CCPs, même si nous avons confirmé certaines spécificités *in vitro*, les activités enzymatiques semblent se recouper entre certains membres de la famille. L'étude des membres de ces familles (CCP et TCP) sera essentielle à la compréhension de l'importance de la duplication de ces protéines au cours de l'évolution.
L'analyse de la baisse de la détyrosination dans les neurones par traitement avec des ARNs interférents semble révéler qu'une partie de la fraction de tubuline détyrosinée provienne de l'expression de l'isoforme alpha4, une isoforme néosynthétisée sans tyrosine C-terminale. Cette tubuline alpha4 est enrichie dans les cellules très détyrosinées telles que les neurones. Elle pourrait ainsi jouer un rôle capital dans la régulation du cycle de détyrosination/tyrosination. Ces résultats apportent des pistes à l'étude des fonctions de cette isoforme très peu décrite, et notamment dans la régulation fonctionnelle des microtubules neuronaux.

En dévoilant les Tubuline CarboxyPeptidases dont l'activité est connue depuis presque 40 ans ainsi que de nouvelles modifications post-traductionnelles, l'ensemble de nos travaux participent à la compréhension des mécanismes de régulation fonctionnelle des microtubules. Ces travaux contribueront à l'éclaircissement de l'implication des modifications post-traductionnelles et particulièrement du cycle de détyrosination/tyrosination dans des processus physiologiques tels que la mitose ou la différentiation, ainsi que pathologiques tels que la tumorigenèse ou le développement de pathologies cardiaques.



Complément d'information attaché à la partie « Article 1 » :

1. Les vasohibines, des protéines connues

Les vasohibines sont des protéines connues depuis un peu plus d'une dizaine d'années. Elles ont été découvertes et étudiées par l'équipe de Yasufumi Sato au Japon. Les travaux publiés concernent uniquement leur rôle dans l'angiogénèse et le cancer et impliquent que se soient des protéines extracellulaires. Ces travaux dont voici la synthèse proviennent en très grande majorité de l'équipe de Sato.

1.1. Identification des vasohibines 1 et 2

La séquence de la Vasohibine-1 a été clonée en 1999 lors de travaux ayant pour objectif de mettre en évidence des protéines importantes pour le cerveau. Kikuno et al. analysèrent simultanément des banques de gènes humains adultes et fœtaux à la recherche de cDNA codant pour des protéines de plus de 50 kDa. Parmi 100 clones sélectionnés, 27 furent positifs pour l'expression *in vitro* de longues protéines parmi lequel le gène KIAA1036 (Kikuno, Nagase, Ishikawa, Hirosawa, and Miyajima, 1999).

En cherchant à identifier des protéines anti-angiogéniques dont la transcription serait induite par le VEGF, l'équipe de Yasufumi Sato identifia la protéine associée à la séquence KIAA1036. La protéine fut donc baptisée Vasohibine en raison de sa capacité à inhiber l'angiogénèse (Watanabe et al. 2004). Par recherche d'homologie dans les bases de données, la même équipe identifie deux ans plus tard la Vasohibine-2 (Shibuya et al. 2006).

1.2. Des expressions tissulaires faibles mais ubiquitaires ?

D'après l'équipe de Yasufumi Sato, les vasohibines 1 et 2 sont exprimées de manière relativement restreinte. La vasohibine-1 serait préférentiellement exprimée dans les cellules endothéliales alors que la vasohibine-2 serait enrichie dans les cellules mononuclées. Cependant, des travaux d'équipes différentes ainsi que l'analyse des bases de données révèlent une présence tissulaire ubiquitaire de ces deux protéines (Kishlyansky et al. 2010; Nimmagadda, Geethaloganathan, Pro, Scaal, and Christ, 2007). Kikuno et al. rapporte initialement la présence de KIAA1036 en faible quantité dans l'ensemble des tissus examinés c'est-à-dire le cœur, le cerveau, les poumons, le foie, le muscle, ou même les ovaires (Kikuno et al. 1999). Concernant nos travaux, ils semblent en corrélation avec l'hypothèse d'une faible présence ubiquitaire des vasohibines puisque nous retrouvons leurs ARNs messagers dans le cerveau ainsi que dans différentes cellules (HEKs, MEFs et neurones, données non-publiées). Enfin, les vasohibines 1 et 2 seraient particulièrement enrichies durant le développement (Watanabe et al. 2004; Shibuya et al. 2006).

1.3. Isolation de la Small Vasohibin Binding Protein (SVBP), un partenaire essentiel

La recherche de partenaire protéique de la vasohibine-1 par la technique de double hybride, révéla une petite protéine constituée de 66 acides aminés et renommée Small Vasohibin Binding Protein (SVBP). Ses interactions avec la vasohibine-1 et la vasohibine-2 ont été respectivement estimées à 31 nM et 87 nM par technique de résonance plasmonique de surface (Suzuki et al. 2010).

La SVBP semble exprimée de manière constitutive dans les cellules endothéliales. Celle-ci formerait un héterodimère avec les vasohibines favorisant leur solubilité. La diminution de l'expression de SVBP dans les cellules endothéliales réduit considérablement la quantité de vasohibine-1 qui semble anormalement ubiquitinylée et dégradée par le protéasome. Enfin, alors que la vasohibine-1 est observable dans l'ensemble de la cellule endothéliale, SVBP se concentre au pôle apical. Ces observations amènent les auteurs à proposer un rôle essentiel de SVBP dans la sécrétion des vasohibines (Suzuki et al. 2010).

1.4. Les souris invalidées pour chacune de ces protéines sont viables

Les souris déficientes pour la vasohibine-1 ou la vasohibine-2 ont été générées. Elles sont viables et ne présentent pas de phénotype apparent (Kimura et al. 2016). En conditions favorables, les souris invalidées pour la Vasohibine 1 semblent d'ailleurs jouir d'une longévité meilleure et plus saine (Takeda, Suzuki, Yamada, Katagiri, and Sato, 2017). En conditions de stress cependant, elles développent diverses pathologies telles que des néphropathies ou des maladies vasculaires (Furutani, Shiozaki-Sato, Hara, Sato, and Kojima, 2015; Hinamoto et al. 2014). Les souris invalidées pour ces protéines, très peu caractérisées, ont surtout été utilisées pour l'étude de leurs impacts dans le cancer (voir paragraphe 4.6).

1.5. Rôles des Vasohibines dans l'angiogénèse

La vasohibine-1 serait induite dans les cellules endothéliales par le VEGF. Elle inhiberait l'angiogénèse en limitant la prolifération et la migration des cellules endothéliales (**Figure 27**, Watanabe et al. 2004). La surexpression de cette protéine entraine l'apoptose des cellules fibroblastiques (Kern, Bauer, Rychli, Wojta, and Ritsch, 2008; Kern, Steurer, Gastl, Gunsilius, and Untergasser, 2009). De manière surprenante, la vasohibine-2 qui partage 52% d'homologie avec la vasohibine-1 aurait des fonctions antagonistes à cette dernière. En effet, la vasohibine-2 semble stimuler l'angiogénèse et sa surexpression favorise la prolifération et la migration cellulaire (Takahashi et al. 2012; Xue et al. 2013, 2014). Enfin, malgré l'absence de séquence signal, les deux protéines sont décrites comme sécrétées et exerçant leur effet sur l'angiogénèse de manière paracrine.



Figure 27 : Modèle de régulation l'angiogénèse de par les vasohibines 1 et 2. La vasohibine 1 serait exprimée dans les cellules endothéliales (ECs) et freinerait l'angiogenèse alors que la vasohibine-2 serait exprimée par les cellules mononuclées dérivées de la moelle osseuse (MNCs) et stimulerait l'angiogénèse. (Adapté de Sato 2013)

1.6. Implication dans le cancer

Depuis leurs découvertes, les travaux réalisés sur ces deux protéines se sont particulièrement concentrés sur leurs rôles dans la pathologie du cancer. En effet, les deux homologues sont enrichis dans de nombreux types de tumeurs (hépato-carcinome, cancer de la prostate, des ovaires ou du sein) et sont associés à un mauvais pronostic vital des patients (Yoshinaga et al. 2008; Tamaki et al. 2009; Tamaki et al. 2010; Yoshinaga et al. 2010; Chan et al. 2012; Zhao et al. 2012; Miyazaki et al. 2012; Wang et al. 2012; Kosaka et al. 2013; Kitajima et al. 2014; Yan et al. 2014; Zhang et al. 2014; Liu et al. 2015; Shen et al. 2016; Xue et al. 2013; Kim et al. 2016.; Takahashi et al. 2012; Li et al. 2014b).

L'induction de l'expression de la vasohibine-1 semble protectrice. Elle réduirait la prolifération, la migration et l'invasivité des cellules et entrainerait leur apoptose diminuant ainsi la croissance tumorale (Watanabe et al. 2004; Naito et al. 2009; Hosaka and Kimura 2009; Li et al. 2010; Heishi et al. 2010; Ito et al. 2013; Liu et al. 2015; Takahashi et al. 2015; Horie et al. 2016; Takahashi et al. 2016). Au contraire, l'expression de la vasohibine-2 aurait les effets inverses et promouvrait la tumorigenèse (Kitahara et al. 2014b; Koyanagi et al. 2013; Z. Li et al. 2014; Takahashi et al. 2012; Tu et al. 2016, 2017; Xue et al. 2013, 2014) (**Figure 28**). Par ailleurs, la souris invalidée pour la vasohibine-1 présente une augmentation du nombre de métastases (Ito et al. 2013) alors que la déficience en vasohibine-2 améliore le phénotype de souris atteintes de cancer gastro-intestinal (Kitahara et al. 2014).



Figure 28 : Impacts potentiels des vasohibines dans le cancer. Ces effets passeraient par la régulation de l'angiogénèse de la tumeur. En inhibant l'angiogénèse, la vasohibine-1 réduirait la croissance tumorale. A l'inverse, la vasohibine-2 activant l'angiogénèse, favoriserait la croissance tumorale.

1.7. Une possible activité catalytique

C'est en alignant les séquences de plusieurs organismes qu'une équipe d'Oxford a révélé une homologie de séquence des vasohibines avec les TransGlutaminases-Like (TG-Like) et notamment la conservation de la triade catalytique non canonique Cys-His-Ser (Sanchez-Pulido and Ponting 2016). Si peu de choses sont connues sur les TG-Like, le mécanisme des transglutaminases est bien décrit et met en avant le rôle prépondérant du calcium dans l'activation de l'enzyme. Après fixation de celuici, la cystéine catalytique activée par l'histidine, réalise l'attaque nucléophile sur le substrat (Y. Song et al. 2013). Sanchez-Pulido et Ponting indiquent que les vasohibines ont conservé dans leur séquence le glutamate nécessaire à la chélation d'un ion calcium. Ces résultats publiés peu avant notre première analyse en masse spectrométrie nous a vivement encouragé à considérer ces protéines comme des candidats valables.

2. Conclusion

Dans l'ensemble, les travaux réalisés sur ces protéines se concentrent surtout sur leurs fonctions physiologiques et notamment dans l'angiogénèse et les cancers. La description des caractéristiques biochimiques des vasohibines humaines et murines sont restreintes et confuses. On révèle des discordances dans les résultats publiés concernant leur expression (localisation, épissage alternatif), sur leurs modifications post-traductionnelles (protéolyse), ainsi que leurs localisations tissulaires et cellulaires (sécrétée, nucléaire ou cytoplasmique). Avec la découverte de leur activité catalytique intracellulaire conduisant à la détyrosination de la tubuline alpha, leurs caractéristiques devront être examinées de nouveau, de manière plus complète.

REFERENCES

BIBLIOGRAPHIQUES

- Ahvazi, B., Boeshans, K. M., Idler, W., Baxa, U., & Steinert, P. M. Roles of calcium ions in the activation and activity of the transglutaminase 3 enzyme. *Journal of Biological Chemistry* **2003**, *278*(26), 23834–23841.
- Aillaud, C., Bosc, C., Saoudi, Y., Denarier, E., Peris, L., Sago, L., ... Moutin, M.-J. Evidence for new Cterminally truncated variants of - and -tubulins. *Molecular Biology of the Cell* 2016, 27, 640– 653.
- Akhmanova, A., & Hoogenraad, C. C. Microtubule minus-end-targeting proteins. *Current Biology* **2015**, *25*(4), R162–R171.
- Amos, L. a, & Schlieper, D. Microtubules and maps. *Advances in Protein Chemistry* **2005**, *71*(04), 257–98.
- Arce, C. a, & Barra, H. S. Association of tubulinyl-tyrosine carboxypeptidase with microtubules. *FEBS Letters* **1983**, *157*(1), 75–8.
- Arce, C. a, & Barra, H. S. Release of C-terminal tyrosine from tubulin and microtubules at steady state. *The Biochemical Journal* **1985**, *226*(1), 311–7.
- Arce, C. a, Barra, H. S., Rodriguez, J. a, & Caputto, R. Tentative identification of the amino acid that binds tyrosine as a single unit into a soluble brain protein. *FEBS Letters* **1975**, *50*(1), 5–7.
- Arce, C. a., Hallak, M. E., Rodriguez, J. a., Barra, H. S., & Caputio, R. Capability of Tubulin and Microtubules To Incorporate and To Release Tyrosine and Phenylalanine and the Effect of the Incorporation of These Amino Acids on Tubulin Assembly. *Journal of Neurochemistry* **1978**, *31*, 205–210.
- Arce, C. a., Rodriguez, J. a., Barra, H. S., & Caputto, R. Incorporation of I???Tyrosine, I???Phenylalanine and I???3,4???Dihydroxyphenylalanine as Single Units into Rat Brain Tubulin. *European Journal of Biochemistry* **1975**, *59*, 145–149.
- Argarana, C. E., Barra, H. S., & Caputto, R. Tubulinyl-tyrosine carboxypeptidase from chicken brain: properties and partial purification. *Journal of Neurochemistry* **1980**, *34*(1), 114–8.
- Argaraña, C. E., Barra, H. S., & Caputto, R. Release of [14C]tyrosine from tubulinyl-[14C]tyrosine by brain extract. Separation of a carboxypeptidase from tubulin-tyrosine ligase. *Molecular and Cellular Biochemistry* **1978**, *19*(1), 17–21.
- Argaraña, C. E., Barra, H. S., & Caputto, R. Inhibition of tubulinyl-tyrosine carboxypeptidase by brain soluble RNA and proteoglycan. *The Journal of Biological Chemistry* **1981**, *256*(2), 827–30.
- Arimura, N., & Kaibuchi, K. Neuronal polarity: from extracellular signals to intracellular mechanisms. *Nature Reviews Neuroscience* **2007**, *8*(3), 194–205.
- Badin-Larçon, a C., Boscheron, C., Soleilhac, J. M., Piel, M., Mann, C., Denarier, E., ... Job, D.
 Suppression of nuclear oscillations in Saccharomyces cerevisiae expressing Glu tubulin.
 Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America 2004, 101(15), 5577–82.

- Barisic, M., Silva e sousa, R., & Tripathy, S. Microtubules detyrosination guides chromosomes during mitosis. *Science Report* **2015**, (April), 1–9.
- Barra, H. S. Some common properties of the protein that incorporates tyrosine as a single unit and the microtubule proteins **1974**, *60*(4), 1384–1390.
- Barra, H. S., Arce, C. A., & Caputto, R. Total Tubulin and Its Aminoacylated and Non-aminoacylated Forms During the Development of Rat Brain **1980**, *446*, 439–446.
- Barra, H. S., Arce, C. a., Rodriguez, J. a., & Caputto, R. Incorporation of Phenylalanine As a Single Unit Into Rat Brain Protein: Reciprocal Inhibition By Phenylalanine and Tyrosine of Their Respective Incorporations. *Journal of Neurochemistry* **1973**, *21*, 1241–1251.
- Barra, H. S., & Argaraña, C. E. Activation of tubulinyl-tyrosine carboxypeptidase by spermine, spermidine and putrescine. *Biochemical and Biophysical Research Communications* **1982**, *108*(2), 654–7.
- Barra, H. S., Rodriguez, J. A., Arce, C. A., & Caputto, R. A soluble preparation from rat brain that incorporates into its own proteins (14 C)arginine by a ribonuclease-sensitive system and (14 C)tyrosine by a ribonuclease-insensitive system. *Journal of Neurochemistry* 1973, 20(1), 97–108.
- Bartolini, F., Moseley, J. B., Schmoranzer, J., Cassimeris, L., Goode, B. L., & Gundersen, G. G. The formin mDia2 stabilizes microtubules independently of its actin nucleation activity. *The Journal of Cell Biology* **2008**, *181*(3), 523–536.
- Belmadani, S., Poüs, C., Ventura-Clapier, R., Fischmeister, R., & Méry, P. F. Post-translational modifications of cardiac tubulin during chronic heart failure in the rat. *Molecular and Cellular Biochemistry* 2002, 237, 39–46.
- Berezniuk, I., Lyons, P. J., Sironi, J. J., Xiao, H., Setou, M., Angeletti, R. H., ... Fricker, L. D. Cytosolic carboxypeptidase 5 removes alpha- and gamma-linked glutamates from tubulin. *The Journal of Biological Chemistry* **2013**.
- Berkowitz, S. A., & Wolff, J. Intrinsic calcium sensitivity of tubulin polymerization. The contributions of temperature, tubulin concentration, and associated proteins. *The Journal of Biological Chemistry* **1981**, *256*(21), 11216–23.
- Bieling, P., Kandels-Lewis, S., Telley, I. A., van Dijk, J., Janke, C., & Surrey, T. CLIP-170 tracks growing microtubule ends by dynamically recognizing composite EB1/tubulin-binding sites. *The Journal* of Cell Biology **2008**, 183(7), 1223–1233.
- Bosson, A., Soleilhac, J.-M., Valiron, O., Job, D., Andrieux, A., & Moutin, M.-J. Cap-Gly Proteins at Microtubule Plus Ends: Is EB1 Detyrosination Involved? *PLoS ONE* **2012**, *7*(3), e33490.
- Bré, Marie, & Kreis, E. Control of Microtubule Nucleation and Stability in Madin-Darby Canine Kidney Cells : The Occurrence of Noncentrosomal , Stable Detyrosinated Microtubules **1987**, *105*(September), 1283–1296.
- Brunet, S., Sardon, T., Zimmerman, T., Wittmann, T., Pepperkok, R., Karsenti, E., & Vernos, I. Characterization of the TPX2 domains involved in microtubule nucleation and spindle assembly in Xenopus egg extracts. *Molecular Biology of the Cell* **2004**, *15*(12), 5318–28.

- Bulinski, J. C., & Gundersen, G. G. Stabilization of post-translational modification of microtubules during cellular morphogenesis. *BioEssays : News and Reviews in Molecular, Cellular and Developmental Biology* **1991**, *13*(6), 285–93.
- Burgess, T. L., Skoufias, D. A., & Wilson, L. Disruption of the golgi apparatus with brefeldin a does not destabilize the associated detyrosinated microtubule network. *Cell Motility and the Cytoskeleton* **1991**, *20*(4), 289–300.
- Cassimeris, L. The oncoprotein 18/stathmin family of microtubule destabilizers. *Current Opinion in Cell Biology* **2002**, *14*, 18–24.
- Chan, M. S. M., Wang, L., Chanplakorn, N., Tamaki, K., Ueno, T., Toi, M., ... Sasano, H. Effects of estrogen depletion on angiogenesis in estrogen-receptor-positive breast carcinoma--an immunohistochemical study of vasohibin-1 and CD31 with correlation to pathobiological response of the patients in neoadjuvant aromatase inhibitor therapy. *Expert Opinion on Therapeutic Targets* **2012**, *16 Suppl* 1, S69–78.
- Chang, W., Webster, D. R., Salam, A. a, Gruber, D., Prasad, A., Eiserich, J. P., & Bulinski, J. C. Alteration of the C-terminal amino acid of tubulin specifically inhibits myogenic differentiation. *The Journal of Biological Chemistry* **2002**, *277*(34), 30690–8.
- Chapin, S. J., & Bulinski, J. C. Cellular microtubules heterogeneous in their content of microtubuleassociated protein 4 (MAP4). *Cell Motility and the Cytoskeleton* **1994**, *27*(2), 133–149.
- Chrétien, D., & Wade, R. H. New data on the microtubule surface lattice. *Biology of the Cell* **1991**, 71(1-2), 161–74.
- Cianfrocco, M. a., DeSantis, M. E., Leschziner, A. E., & Reck-Peterson, S. L. Mechanism and Regulation of Cytoplasmic Dynein. *Annual Review of Cell and Developmental Biology* **2015**, *31*, 83–108.
- Conde, C., & Cáceres, A. Microtubule assembly, organization and dynamics in axons and dendrites. *Nature Reviews. Neuroscience* **2009**, *10*(5), 319–32.
- Contin, M., Purro, S. a., Bisig, C. G., Barra, H. S., & Arce, C. a. Inhibitors of protein phosphatase 1 and 2A decrease the level of tubulin carboxypeptidase activity associated with microtubules. *European Journal of Biochemistry* **2003**, *270*(24), 4921–4929.
- Dammermann, A., Desai, A., & Oegema, K. The minus end in sight. *Current Biology* **2003**, *13*(03), 614–624.
- Deanin, G. Tyrosyltubulin Ligase Activity in Brain , Skeletal the Developing Muscle , and Liver of **1977**, 233, 230–233.
- Del Alonso, C. a., Arce, C. a., & Barra, H. C. Tyrosinatable and non-tyrosinatable tubulin subpopulations in rat muscle in comparison with those in brain. *Biochimica et Biophysica Acta Protein Structure and Molecular Enzymology* **1993**, *1163*, 26–30.
- Deloulme, J.-C., Gory-Fauré, S., Mauconduit, F., Chauvet, S., Jonckheere, J., Boulan, B., ... Andrieux, A. Microtubule-associated protein 6 mediates neuronal connectivity through Semaphorin 3Edependent signalling for axonal growth. *Nature Communications* **2015**, *6*, 7246.

- Desai, A., & Mitchison, T. J. MICROTUBULE POLYMERIZATION DYNAMICS. *Annual Review of Cell and Developmental Biology* **1997**, *13*(1), 83–117.
- Ditamo, Y., Dentesano, Y. M., Purro, S. a., Arce, C. a., & Bisig, C. G. Post-Translational Incorporation of L-Phenylalanine into the C-Terminus of α-Tubulin as a Possible Cause of Neuronal Dysfunction. *Scientific Reports* **2016**, *6*(November), 38140.
- Dixit, R., Barnett, B., Lazarus, J. E., Tokito, M., Goldman, Y. E., & Holzbaur, E. L. F. Microtubule plusend tracking by CLIP-170 requires EB1. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* **2009**, *106*, 492–7.
- Duellberg, C., Trokter, M., Jha, R., Sen, I., Steinmetz, M. O., & Surrey, T. Reconstitution of a hierarchical +TIP interaction network controlling microtubule end tracking of dynein. *Nature Cell Biology* **2014**, *16*(8), 804–811.
- Dunn, S., Morrison, E. E., Liverpool, T. B., Molina-París, C., Cross, R. a, Alonso, M. C., & Peckham, M. Differential trafficking of Kif5c on tyrosinated and detyrosinated microtubules in live cells. *Journal of Cell Science* **2008**, *121*(Pt 7), 1085–95.
- Dunn, S., Morrison, E. E., Liverpool, T. B., Molina-París, C., Cross, R. a, Alonso, M. C., & Peckham, M. Differential trafficking of Kif5c on tyrosinated and detyrosinated microtubules in live cells. *Journal of Cell Science* 2008, 121(Pt 7), 1085–95.
- Dutcher, S. K. Motile organelles: the importance of specific tubulin isoforms. *Current Biology : CB* **2001**, *11*(11), R419–22.
- Eddé, B., Rossier, J., Le Caer, J. P., Promé, J. C., Desbruyères, E., Gros, F., & Denoulet, P. Polyglutamylated alpha-tubulin can enter the tyrosination/detyrosination cycle. *Biochemistry* **1992**, *31*(2), 403–10.
- Elie, A., Prezel, E., Guérin, C., Denarier, E., Ramirez-Rios, S., Serre, L., ... Arnal, I. Tau co-organizes dynamic microtubule and actin networks. *Scientific Reports* **2015**, *5*, 9964.
- Erck, C., Frank, R., & Wehland, J. Tubulin-tyrosine ligase, a long-lasting enigma. *Neurochemical Research* **2000**, *25*(1), 5–10.
- Erck, C., Peris, L., Andrieux, A., Meissirel, C., Gruber, A. D., Vernet, M., ... Saoudi, Y. A vital role of tubulin-tyrosine-ligase for neuronal organization **2005**, *102*(22).
- Erck, C., Peris, L., Andrieux, A., Meissirel, C., Gruber, A. D., Vernet, M., ... Wehland, J. A vital role of tubulin-tyrosine-ligase for neuronal organization. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 2005, 102(22), 7853–8.
- Ersfeld, K., Wehland, J., Plessmann, U., Dodemont, H., Gerke, V., & Weber, K. Characterization of the tubulin-tyrosine ligase. J. Cell Biol. **1993**, 120(3), 725–732.
- Evans, L., Mitchison, T., & Kirschner, M. Influence of the centrosome on the structure of nucleated microtubules. *The Journal of Cell Biology* **1985**, *100*(4), 1185–91.
- Fonrose, X., Ausseil, F., Soleilhac, E., Masson, V., David, B., Pouny, I., ... Lafanechère, L. Parthenolide inhibits tubulin carboxypeptidase activity. *Cancer Research* **2007**, *67*(7), 3371–8.

- Furutani, Y., Shiozaki-Sato, Y., Hara, M., Sato, Y., & Kojima, S. Hepatic fibrosis and angiogenesis after bile duct ligation are endogenously expressed vasohibin-1 independent. *Biochemical and Biophysical Research Communications* 2015, 463(3), 384–8.
- Gadadhar, S., Bodakuntla, S., Natarajan, K., & Janke, C. The tubulin code at a glance. *Journal of Cell Science* **2017**, *130*, 1347–1353.
- Geuens, G., Gundersen, G. G., Nuydens, R., Cornelissen, F., Bulinski, J. C., & DeBrabander, M. Ultrastructural colocalization of tyrosinated and detyrosinated alpha-tubulin in interphase and mitotic cells. *The Journal of Cell Biology* **1986**, *103*(5), 1883–93.
- Gobrecht, P., Andreadaki, A., Diekmann, H., Heskamp, A., Leibinger, M., & Fischer, D. Promotion of Functional Nerve Regeneration by Inhibition of Microtubule Detyrosination. *Journal of Neuroscience* **2016**, *36*(14), 3890–3902.
- Gobrecht, P., Andreadaki, A., Diekmann, H., Heskamp, A., Leibinger, M., & Fischer, D. Promotion of Functional Nerve Regeneration by Inhibition of Microtubule Detyrosination. *Journal of Neuroscience* **2016**, *36*(14), 3890–3902.
- Gomis-Rüth, S., Wierenga, C. J., & Bradke, F. Plasticity of polarization: changing dendrites into axons in neurons integrated in neuronal circuits. *Current Biology : CB* **2008**, *18*(13), 992–1000.
- Gruss, O. J., Wittmann, M., Yokoyama, H., Pepperkok, R., Kufer, T., Silljé, H., ... Vernos, I. Chromosome-induced microtubule assembly mediated by TPX2 is required for spindle formation in HeLa cells. *Nature Cell Biology* **2002**, *4*, 871–879.
- Gu, W., Lewis, S. A., & Cowan, N. J. Generation of antisera that discriminate among mammalian alpha-tubulins: introduction of specialized isotypes into cultured cells results in their coassembly without disruption of normal microtubule function. *The Journal of Cell Biology* **1988**, *106*(6), 2011–22.
- Gu, W., Lewis, S. A., & Cowan, N. J. Generation of antisera that discriminate among mammalian alpha-tubulins: introduction of specialized isotypes into cultured cells results in their coassembly without disruption of normal microtubule function. *The Journal of Cell Biology* **1988**, *106*(6), 2011–22.
- Gumy, L. F., Chew, D. J., Tortosa, E., Katrukha, E. A., Kapitein, L. C., Tolkovsky, A. M., ... Fawcett, J. W. The Kinesin-2 Family Member KIF3C Regulates Microtubule Dynamics and Is Required for Axon Growth and Regeneration. *Journal of Neuroscience* **2013**, *33*(28), 11329–11345.
- Gundersen, G. G., & Bulinski, J. C. Distribution of Tyrosinated and Nontyrosinated a-Tubulin during Mitosis **1986**, *102*(March), 1118–1126.
- Gundersen, G. G., & Bulinski, J. C. Microtubule arrays in differentiated cells contain elevated levels of a post-translationally modified form of tubulin. *European Journal of Cell Biology* **1986**, *42*(2), 288–94.
- Gundersen, G. G., & Kalnoski, M. H. Distinct Populations of Microtubules : Tyrosinated and Nontyrosinated Alpha Tubulin Are Distributed Differently In Vivo **1984**, *38*(October), 779–789.

- Gundersen, G. G., & Khawaja, S. Generation of a Stable, Posttranslationally Modified Microtubule Array Is an Early Event in Myogenic Differentiation **1989**, *109*(November), 2275–2288.
- Gundersen, G. G., Khawaja, S., & Bulinski, J. C. Postpolymerization detyrosination of alpha-tubulin: a mechanism for subcellular differentiation of microtubules. *The Journal of Cell Biology* **1987**, *105*(1), 251–64.
- Gurland, G., & Gundersen, G. G. Stable, detyrosinated microtubules function to localize vimentin intermediate filaments in fibroblasts. *Journal of Cell Biology* **1995**, *131*(5), 1275–1290.
- Gyoeva, F. K., & Gelfand, V. I. Coalignment of vimentin intermediate filaments with microtubules depends on kinesin. *Nature* **1991**, *353*(6343), 445–448.
- Hallak, M. E., Rodriguez, J. A., Barra, H. S., & Caputto, R. Release of tyrosine from tyrosinated tubulin. Some common factors that affect this process and the assembly of tubulin. *FEBS Letters* **1977**, 73(2), 147–50.
- Hammond, J. W., Huang, C., Kaech, S., Jacobson, C., Banker, G., & Verhey, K. J. Posttranslational Modifications of Tubulin and the Polarized Transport of Kinesin-1 in Neurons **2010**, *21*, 572– 583.
- Heishi, T., Hosaka, T., Suzuki, Y., Miyashita, H., Oike, Y., Takahashi, T., ... Sato, Y. Endogenous
 Angiogenesis Inhibitor Vasohibin1 Exhibits Broad-Spectrum Antilymphangiogenic Activity and
 Suppresses Lymph Node Metastasis. *The American Journal of Pathology* 2010, 176(4), 1950–1958.
- Hendershott, M. C., & Vale, R. D. Regulation of microtubule minus-end dynamics by CAMSAPs and Patronin. *Proceedings of the National Academy of Sciences* **2014**, *111*, 5860–5865.
- Hinamoto, N., Maeshima, Y., Yamasaki, H., Nasu, T., Saito, D., Watatani, H., ... Makino, H. Exacerbation of diabetic renal alterations in mice lacking vasohibin-1. *PloS One* **2014**, *9*(9), e107934.
- Hirokawa, N., Noda, Y., Tanaka, Y., & Niwa, S. Kinesin superfamily motor proteins and intracellular transport. *Nature Reviews. Molecular Cell Biology* **2009**, *10*(10), 682–96.
- Hirokawa, N., & Takemura, R. Molecular motors and mechanisms of directional transport in neurons. *Nature Reviews. Neuroscience* **2005**, *6*(3), 201–14.
- Hiromu Murofushi. Purification Ligase from and Characterization of Tubulin-Tyrosine Porcine. *Biochem, J* **1980**, *87*(3), 979–984.
- Homma, N., Takei, Y., Tanaka, Y., Nakata, T., Terada, S., Kikkawa, M., ... Hirokawa, N. Kinesin superfamily protein 2A (KIF2A) functions in suppression of collateral branch extension. *Cell* 2003, 114, 229–239.
- Horie, S., Suzuki, Y., Kobayashi, M., Kadonosono, T., Kondoh, S., Kodama, T., & Sato, Y. Distinctive role of vasohibin-1A and its splicing variant vasohibin-1B in tumor angiogenesis. *Cancer Gene Therapy* **2016**, *23*(5), 133–141.

- Hosaka, T., & Kimura, H. Vasohibin-1 Expression in Endothelium of Tumor Blood Vessels Regulates Angiogenesis. *The American Journal of Pathology* **2009**, *175*(1), 430–439.
- Hou, Y., & Witman, G. B. Dynein and intraflagellar transport. *Dyneins* **2012**, *334*, 394–421.
- Howard, J., & Hyman, A. a. Microtubule polymerases and depolymerases. *Current Opinion in Cell Biology* **2007**, *19*, 31–35.
- Howell, B., Larsson, N., Gullberg, M., & Cassimeris, L. Dissociation of the tubulin-sequestering and microtubule catastrophe-promoting activities of oncoprotein 18/stathmin. *Molecular Biology of the Cell* **1999**, *10*(January), 105–18.
- Hyman, a a, Salser, S., Drechsel, D. N., Unwin, N., & Mitchison, T. J. Role of GTP hydrolysis in microtubule dynamics: information from a slowly hydrolyzable analogue, GMPCPP. *Molecular Biology of the Cell* **1992**, *3*(October), 1155–1167.
- Infante, a S., Stein, M. S., Zhai, Y., Borisy, G. G., & Gundersen, G. G. Detyrosinated (Glu) microtubules are stabilized by an ATP-sensitive plus-end cap. *Journal of Cell Science* **2000**, *113 (Pt 2*, 3907–19.
- Ito, S., Miyashita, H., Suzuki, Y., Kobayashi, M., Satomi, S., & Sato, Y. Enhanced cancer metastasis in mice deficient in vasohibin-1 gene. *PloS One* **2013**, *8*(9), e73931.
- Jacobson, C., Schnapp, B., & Banker, G. a. A change in the selective translocation of the kinesin-1 motor domain marks the initial specification of the axon. *Neuron* **2006**, *49*, 797–804.
- Jha, R., & Surrey, T. Regulation of processive motion and microtubule localization of cytoplasmic dynein. *Biochemical Society Transactions* **2015**, *43*, 48–57.
- Job, D., Valiron, O., & Oakley, B. Microtubule nucleation. *Current Opinion in Cell Biology* **2003**, *15*, 111–117.
- Kapitein, L. C., & Hoogenraad, C. C. Which way to go? Cytoskeletal organization and polarized transport in neurons. *Molecular and Cellular Neuroscience* **2011**, *46*(1), 9–20.
- Kapitein, L. C., Schlager, M. a., Kuijpers, M., Wulf, P. S., van Spronsen, M., MacKintosh, F. C., & Hoogenraad, C. C. Mixed Microtubules Steer Dynein-Driven Cargaison Transport into Dendrites. *Current Biology* 2010, 20(4), 290–299.
- Kato, C., Miyazaki, K., Nakagawa, A., Ohira, M., Nakamura, Y., Ozaki, T., ... Nakagawara, A. Low expression of human tubulin tyrosine ligase and suppressed tubulin tyrosination/detyrosination cycle are associated with impaired neuronal differentiation in neuroblastomas with poor prognosis. *International Journal of Cancer. Journal International Du Cancer* 2004, *112*(3), 365– 75.
- Kern, J., Bauer, M., Rychli, K., Wojta, J., & Ritsch, A. Alternative Splicing of Vasohibin-1 Generates an Inhibitor of Endothelial Cell Proliferation, Migration, and Capillary Tube Formation **2008**.
- Kern, J., Steurer, M., Gastl, G., Gunsilius, E., & Untergasser, G. Vasohibin inhibits angiogenic sprouting in vitro and supports vascular maturation processes in vivo. *BMC Cancer* **2009**, *9*, 284.

- Kerr, J. P., Robison, P., Shi, G., Bogush, A. I., Kempema, A. M., Hexum, J. K., ... Ward, C. W. Detyrosinated microtubules modulate mechanotransduction in heart and skeletal muscle. *Nature Communications* 2015, *6*, 8526.
- Khawaja, S., & Gregg, G. G. Enhanced Stability of Microtubules Enriched in Detyrosinated Tubulin Is Not a Direct Function of Detyrosination Level Quantxfication of Microtubules. *The Journal of Cell Biology* **1988**, *106*(January), 141–149.
- Kikuno, R., Nagase, T., Ishikawa, K., Hirosawa, M., & Miyajima, N. Prediction of the Coding Sequences of Unidentified Human Genes . XIV . The Complete Sequences of 100 New cDNA Clones from Brain Which Code for Large Proteins in vitro **1999**, 205, 197–205.
- Kim, J.-C., Kim, K.-T., Park, J.-T., Kim, H.-J., Sato, Y., & Kim, H.-S. Expression of vasohibin-2 in pancreatic ductal adenocarcinoma promotes tumor progression and is associated with a poor clinical outcome. *Hepato-Gastroenterology* (n.d.), 62(138), 251–6.
- Kimura, H., Miyashita, H., Suzuki, Y., Kobayashi, M., Watanabe, K., Sonoda, H., ... Sato, Y. Distinctive localization and opposed roles of vasohibin-1 and vasohibin-2 in the regulation of angiogenesis 2009, 113(19), 4810–4819.
- Kimura, H., Miyashita, H., Suzuki, Y., Kobayashi, M., Watanabe, K., Sonoda, H., ... Sato, Y. Distinctive localization and opposed roles of vasohibin-1 and vasohibin-2 in the regulation of angiogenesis 2016, 113(19), 4810–4819.
- Kishlyansky, M., Vojnovic, J., Roudier, E., Gineste, C., Decary, S., Forn, P., ... Birot, O. Striated muscle angio-adaptation requires changes in Vasohibin-1 expression pattern. *Biochemical and Biophysical Research Communications* **2010**, *399*(3), 359–364.
- Kitahara, S., Suzuki, Y., Morishima, M., Yoshii, A., Kikuta, S., Shimizu, K., ... Ezaki, T. Vasohibin-2 modulates tumor onset in the gastrointestinal tract by normalizing tumor angiogenesis **2014**, 1– 15.
- Kitahara, S., Suzuki, Y., Morishima, M., Yoshii, A., Kikuta, S., Shimizu, K., ... Ezaki, T. Vasohibin-2 modulates tumor onset in the gastrointestinal tract by normalizing tumor angiogenesis. *Molecular Cancer* **2014**, *13*, 99.
- Kitajima, T., Toiyama, Y., Tanaka, K., Saigusa, S., & Kobayashi, M. Vasohibin-1 Increases the Malignant Potential of Colorectal Cancer and Is a Biomarker of Poor Prognosis **2014**, *5330*, 5321–5329.
- Konishi, Y., & Setou, M. Tubulin tyrosination navigates the kinesin-1 motor domain to axons. *Nature Neuroscience* **2009**, *12*(5), 559–67.
- Konishi, Y., & Setou, M. Tubulin tyrosination navigates the kinesin-1 motor domain to axons. *Nature Neuroscience* **2009**, *12*(5), 559–67.
- Kosaka, T., Miyazaki, Y., Miyajima, A., Mikami, S., Hayashi, Y., Tanaka, N., ... Oya, M. The prognostic significance of vasohibin-1 expression in patients with prostate cancer. *British Journal of Cancer* 2013, 108(10), 2123–9.

Koyanagi, T., Suzuki, Y., Saga, Y., Machida, S., Takei, Y., Fujiwara, H., ... Sato, Y. In vivo delivery of siRNA targeting vasohibin-2 decreases tumor angiogenesis and suppresses tumor growth in ovarian cancer. *Cancer Science* **2013**, *104*(12), 1705–10.

Kreis, T. E. Microtubules containing detyrosinated tubulin 1987, 6(9), 2597–2606.

- Kreitzer, G., Liao, G., & Gundersen, G. G. Detyrosination of Tubulin Regulates the Interaction of Intermediate Filaments with Microtubules In Vivo via a Kinesin-dependent Mechanism **1999**, *10*(April), 1105–1118.
- Kumar, N., & Flavin, M. Preferential action of a brain detyrosinolating carboxypeptidase on polymerized tubulin. *The Journal of Biological Chemistry* **1981**, *256*(14), 7678–86.
- Kumar, N., & Flavin, M. Modulation of Some Parameters. *European Journal of Biochemistry* **1982**, *128*, 215–222.
- Lafanechère, L., Courtay-Cahen, C., Kawakami, T., Jacrot, M., Rüdiger, M., Wehland, J., ... Margolis, R.
 L. Suppression of tubulin tyrosine ligase during tumor growth. *Journal of Cell Science* 1998, 111 (*Pt 2*, 171–81.

Lafanechère, L., & Job, D. The third tubulin pool. *Neurochemical Research* **2000**, *25*(1), 11–8.

- Larcher, J. C., Boucher, D., Lazereg, S., Gros, F., & Denoulet, P. Interaction of kinesin motor domains with α - and β -tubulin subunits at a tau-independent binding site: Regulation by polyglutamylation. *Journal of Biological Chemistry* **1996**, *271*(36), 22117–22124.
- Letourneau, P. C., & Wire, J. P. Three-dimensional organization of stable microtubules and the Golgi apparatus in the somata of developing chick sensory neurons. *Journal of Neurocytology* **1995**, 24, 207–223.
- Li, D., Zhou, K., Wang, S., Shi, Z., & Yang, Z. Recombinant adenovirus encoding vasohibin prevents tumor angiogenesis and inhibits tumor growth. *Cancer Science* **2010**, *101*(2), 448–452.
- Li, Z., Tu, M., Han, B., Gu, Y., Xue, X., Sun, J., ... Gao, W. Vasohibin 2 Decreases the Cisplatin Sensitivity of Hepatocarcinoma Cell Line by Downregulating p53 **2014**, *9*(3), 1–9.
- Li, Z., Tu, M., Han, B., Gu, Y., Xue, X., Sun, J., ... Gao, W. Vasohibin 2 decreases the cisplatin sensitivity of hepatocarcinoma cell line by downregulating p53. *PloS One* **2014**, *9*(3), e90358.
- Liao, G., & Gundersen, G. G. Kinesin Is a Candidate for Cross-bridging Microtubules and **1998**, *273*(16), 9797–9803.
- Liu, S., Han, B., Zhang, Q., Dou, J., Wang, F., & Lin, W. Vasohibin-1 suppresses colon cancer **2015**, *6*(10).
- Liu, S., Han, B., Zhang, Q., Dou, J., Wang, F., Lin, W., ... Peng, G. Vasohibin-1 suppresses colon cancer. Oncotarget **2015**, *6*(10), 7880–98.
- López-Bendito, G., & Molnár, Z. Thalamocortical development: how are we going to get there? *Nature Reviews Neuroscience* **2003**, *4*(4), 276–289.

- Löwe, J., Li, H., Downing, K. ., & Nogales, E. Refined structure of αβ-tubulin at 3.5 Å resolution. Journal of Molecular Biology **2001**, 313, 1045–1057.
- Lu, M. S., & Johnston, C. A. Molecular pathways regulating mitotic spindle orientation in animal cells. *Development (Cambridge, England)* **2013**, *140*(9), 1843–56.
- Ludueña, R. F. A hypothesis on the origin and evolution of tubulin. International review of cell and molecular biology **2013** (Vol. 302, pp. 41–185). Elsevier.
- Marcos, S., Moreau, J., Backer, S., Job, D., Andrieux, A., & Bloch-Gallego, E. Tubulin tyrosination is required for the proper organization and pathfinding of the growth cone. *PloS One* **2009**, *4*(4), e5405.
- Margolis, R. L., & Wilson, L. Opposite end assembly and disassembly of microtubules at steady state in vitro. *Cell* **1978**, *13*(January), 1–8.
- Martensen, T. M. Preparation of brain tyrosinotubulin carboxypeptidase. *Methods in Cell Biology* **1982**, *24*, 265–9.
- Mary, J., Redeker, V., Le Caer, J. P., Rossier, J., & Schmitter, J. M. Posttranslational modifications in the C-terminal tail of axonemal tubulin from sea urchin sperm. *Journal of Biological Chemistry* **1996**, *271*(17), 9928–9933.
- McKenney, R. J., Huynh, W., Vale, R. D., & Sirajuddin, M. Tyrosination of α-tubulin controls the initiation of processive dynein-dynactin motility. *The EMBO Journal* **2016**, *35*(11), 1175–85.
- Mialhe, A., Lafanechèere, L., Treilleux, I., Prognosis, P., Lafaneche, L., Peloux, N., ... Job, D. Tubulin Detyrosination Is a Frequent Occurrence in Breast Cancers of Poor Prognosis Tubulin Detyrosination Is a Frequent Occurrence in Breast Cancers of **2001**, 5024–5027.
- Miki, H., Okada, Y., & Hirokawa, N. Analysis of the kinesin superfamily: Insights into structure and function. *Trends in Cell Biology* **2005**, *15*(9), 467–476.
- Miller, L. M., Menthena, A., Chatterjee, C., Verdier-Pinard, P., Novikoff, P. M., Horwitz, S. B., & Angeletti, R. H. Increased levels of a unique post-translationally modified betalVb-tubulin isotype in liver cancer. *Biochemistry* **2008**, *47*(28), 7572–82.

Mitchison and Kirschner 1984, Dynamic instability of microtubule growth (n.d.).

- Miyazaki, Y., Kosaka, T., Mikami, S., Kikuchi, E., Tanaka, N., Maeda, T., ... Oya, M. The Prognostic Significance of Vasohibin-1 Expression in Patients with Upper Urinary Tract Urothelial Carcinoma. *Clinical Cancer Research* **2012**, *18*(12), 4145–4153.
- Modesti, M., & Barra, H. The interaction of myelin basic protein with tubulin and the inhibition of tubuline carboxypeptidase **1986**, (2).
- Modesti, N. M., Argarana, C. E., Barra, H. S., & Caputto, R. Inhibition of Brain tubulinyl Tyrosine Carboxypeptidase by Endogenous Proteins **1984**.
- Moores, C. a., Perderiset, M., Francis, F., Chelly, J., Houdusse, A., & Milligan, R. a. Mechanism of microtubule stabilization by doublecortin. *Molecular Cell* **2004**, *14*(Dcx), 833–839.

- Multigner, L., Pignot-Paintrand, I., Saoudi, Y., Job, D., Plessmann, U., Rüdiger, M., & Weber, K. The A and B tubules of the outer doublets of sea urchin sperm axonemes are composed of different tubulin variants. *Biochemistry* **1996**, *35*(33), 10862–71.
- Naito, H., Kidoya, H., Sato, Y., & Takakura, N. Induction and expression of anti-angiogenic vasohibins in the hematopoietic stem/progenitor cell population. *Journal of Biochemistry* **2009**, *145*(5), 653–659.
- Nakata, T., & Hirokawa, N. Microtubules provide directional cues for polarized axonal transport through interaction with kinesin motor head. *The Journal of Cell Biology* **2003**, *162*(6), 1045–55.
- Namba, T., Funahashi, Y., Nakamuta, S., Xu, C., Takano, T., & Kaibuchi, K. Extracellular and Intracellular Signaling for Neuronal Polarity. *Physiological Reviews* **2015**, *95*, 995–1024.
- Neukirchen, D., & Bradke, F. Neuronal polarization and the cytoskeleton. *Seminars in Cell & Developmental Biology* **2011**, *22*(8), 825–833.
- Nimmagadda, S., Geetha-loganathan, P., Pro, F., Scaal, M., & Christ, B. Expression Pattern of Vasohibin During Chick **2007**, (March), 1358–1362.
- Nirschl, J. J., Magiera, M. M., Lazarus, J. E., Janke, C., Holzbaur, E. L. F., Nirschl, J. J., ... Holzbaur, E. L.
 F. Phosphorylation Regulate the Initiation of Dynein- Driven Transport in Neurons Article a -Tubulin Tyrosination and CLIP-170 Phosphorylation Regulate the Initiation of Dynein-Driven Transport in Neurons. *CellReports* 2016, 14(11), 2637–2652.
- Nishita, M., Satake, T., Minami, Y., & Suzuki, A. Regulatory mechanisms and cellular functions of noncentrosomal microtubules. *The Journal of Biochemistry* **2017**, *109*, 20029–20034.
- Olmsted, J. B., Cox, J. V, Asnes, C. F., Parysek, L. M., & Lyon, H. D. Cellular regulation of microtubule organisation. *J. Cell Biol.* **1984**, *99*(1), 28s–32s.
- Palazzo, A. F., Cook, T. A., Alberts, A. S., & Gundersen, G. G. mDia mediates Rho-regulated formation and orientation of stable microtubules. *Nature Cell Biology* **2001**, *3*(8), 723–729.
- Panda, D., Miller, H. P., Banerjee, a, Ludueña, R. F., & Wilson, L. Microtubule dynamics in vitro are regulated by the tubulin isotype composition. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* **1994**, *91*(November), 11358–11362.
- Paturle, L., Wehland, J., Margolis, R. L., & Job, D. Complete separation of tyrosinated, detyrosinated, and nontyrosinatable brain tubulin subpopulations using affinity chromatography. *Biochemistry* **1989**, *28*, 2698–704.
- Paturle-Lafanechère, L., Eddé, B., Denoulet, P., Van Dorsselaer, a, Mazarguil, H., Le Caer, J. P., ... Job,
 D. Characterization of a major brain tubulin variant which cannot be tyrosinated. *Biochemistry* 1991, October 29.
- Paturle-Lafanechère, L., Manier, M., Trigault, N., Pirollet, F., Mazarguil, H., & Job, D. 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* **1994**, *107 (Pt 6*, 1529–43.

- Peris, L., Thery, M., Fauré, J., Saoudi, Y., Lafanechère, L., Chilton, J. K., ... Job, D. Tubulin tyrosination is a major factor affecting the recruitment of CAP-Gly proteins at microtubule plus ends. *The Journal of Cell Biology* **2006**, 174(6), 839–49.
- Peris, L., Wagenbach, M., Lafanechère, L., Brocard, J., Moore, A. T., Kozielski, F., ... Andrieux, A. Motor-dependent microtubule disassembly driven by tubulin tyrosination. *The Journal of Cell Biology* 2009, 185(7), 1159–66.
- Prescott, A. R., Webb, & Rawlins. Microtubules Form Rich Distinct in Post-translationally Modified Arrays in Frog Lens Epithelial **1997**.
- Prescott, A. R., Webb, S. F., Rawlins, D., Shaw, P. J., & Warn, R. M. Microtubules rich in posttranslationally modified alpha-tubulin form distinct arrays in frog lens epithelial cells. *Experimental Eye Research* **1991**, *52*(6), 743–53.
- Prota, A. E., Magiera, M. M., Kuijpers, M., Bargsten, K., Frey, D., Wieser, M., ... Steinmetz, M. O. Structural basis of tubulin tyrosination by tubulin tyrosine ligase. *The Journal of Cell Biology* 2013, 200(3), 259–70.
- Quinones, G. B., Danowski, B. A., Devaraj, A., Singh, V., & Ligon, L. A. The posttranslational modification of tubulin undergoes a switch from detyrosination to acetylation as epithelial cells become polarized. *Molecular Biology of the Cell* **2011**, *22*(7), 1045–57.
- Raybin, & Flavin. Raybin and Flavin 1977, Enzyme which specifically adds tyrosine to the alpha chain of tubulin **1977**.
- Redeker, V. Mass spectrometry analysis of C-terminal posttranslational modifications of tubulins. Methods in cell biology **2010** (First edit, Vol. 95, pp. 77–103). Elsevier.
- Redeker, V., Rossier, J., & Frankfurter, a. Posttranslational modifications of the C-terminus of alphatubulin in adult rat brain: alpha 4 is glutamylated at two residues. *Biochemistry* **1998**, *37*(42), 14838–44.
- Redeker, V., Rusconi, F., Mary, J., Prom?, D., & Rossier, J. Structure of the C-terminal tail of ?-tubulin: Increase of heterogeneity from newborn to adult. *Journal of Neurochemistry* **1996**, *67*, 2104–2114.
- Rishal, I., & Fainzilber, M. Axon-soma communication in neuronal injury. *Nature Reviews. Neuroscience* **2014**, *15*(1), 32–42.
- Ritter, A., Kreis, N.-N., Louwen, F., Wordeman, L., & Yuan, J. Molecular insight into the regulation and function of MCAK. *Critical Reviews in Biochemistry and Molecular Biology* **2016**, *51*(4), 228–245.
- Robison, P., Caporizzo, M. A., Ahmadzadeh, H., Bogush, A. I., Chen, C. Y., Margulies, K. B., ... Prosser,
 B. L. Detyrosinated microtubules buckle and bear load in contracting cardiomyocytes. *Science* 2016, *352*(6284), aaf0659–aaf0659.
- Robison, P., Caporizzo, M. A., Ahmadzadeh, H., Bogush, A. I., Chen, C. Y., Margulies, K. B., ... Prosser,
 B. L. Detyrosinated microtubules buckle and bear load in contracting cardiomyocytes. *Science* 2016, *352*(6284), aaf0659–aaf0659.

- Robison, P., & Prosser, B. L. Microtubule mechanics in the working myocyte. *The Journal of Physiology* **2017**, *595*(12), 3931–3937.
- Rodriguez, A., & Borisy, G. G. Experimental Phenylketonuria : Replacement of Carboxyl Terminal Tyrosine by Phenylalanine in Infant Rat Brain Tubulin **1979**, *206*(October), 463–465.
- Rodriguez, J. a, Barra, H. S., Arce, C. a, Hallak, M. E., & Caputto, R. The reciprocal exclusion by L-dopa (L-3,4-dihydroxyphenylalanine) and L-tyrosine of their incorporation as single units into a soluble rat brain protein. *The Biochemical Journal* **1975**, *149*, 115–121.
- Rodriguez, J. A., & Borisy, G. G. Modification of the C-terminus of brain tubulin during development. *Biochemical and Biophysical Research Communications* **1978**, *83*(2), 579–86.
- Rogowski, K., van Dijk, J., Magiera, M. M., Bosc, C., Deloulme, J.-C., Bosson, A., ... Janke, C. A family of protein-deglutamylating enzymes associated with neurodegeneration. *Cell* **2010**, *143*(4), 564–78.
- Roll-Mecak, A. Intrinsically disordered tubulin tails: Complex tuners of microtubule functions? *Seminars in Cell and Developmental Biology* **2015**, *37*, 11–19.
- Roll-Mecak, A., & McNally, F. J. Microtubule-severing enzymes. *Current Opinion in Cell Biology* **2010**, 22(1), 96–103.
- Roll-Mecak, A., & Vale, R. D. Structural basis of microtubule severing by the hereditary spastic paraplegia protein spastin. *Nature* **2008**, *451*(January), 363–367.
- Rovini, A., Gauthier, G., Bergès, R., Kruczynski, A., Braguer, D., & Honoré, S. Anti-migratory effect of vinflunine in endothelial and glioblastoma cells is associated with changes in EB1 C-terminal detyrosinated/tyrosinated status. *PloS One* **2013**, *8*(6), e65694.
- Sanchez-pulido, L., & Ponting, C. P. Sequence analysis Vasohibins : new transglutaminase-like cysteine proteases possessing a non-canonical Cys-His-Ser catalytic triad **2016**, (January), 1–5.
- Sanchez-Pulido, L., & Ponting, C. P. Vasohibins: New transglutaminase-like cysteine proteases possessing a non-canonical Cys-His-Ser catalytic triad. *Bioinformatics* **2016**, *32*(January), 1441–1445.
- Schroder, H. C., Wehland, J., & Weber, K. Purification of brain tubulin-tyrosine ligase by biochemical and immunological methods. *Journal of Cell Biology* **1985**, *100*(January), 276–281.
- Schulze, E., Asai, D. J., Bulinski, J. C., & Kirschner, M. Posttranslational modification and microtubule stability. *The Journal of Cell Biology* **1987**, *105*(5), 2167–77.
- Sharp, D. J., & Ross, J. L. Microtubule-severing enzymes at the cutting edge. *Journal of Cell Science* **2012**, *125*, 2561–2569.
- Shen, Z., Yan, Y., Ye, C., Wang, B., Jiang, K., Ye, Y., ... Wang, S. The effect of Vasohibin-1 expression and tumor-associated macrophages on the angiogenesis in vitro and in vivo. *Tumor Biology* 2016, 37, 7267–7276.

- Shibuya, T., Watanabe, K., Yamashita, H., Shimizu, K., Miyashita, H., Abe, M., ... Sato, Y. Isolation and characterization of vasohibin-2 as a homologue of VEGF-inducible endothelium-derived angiogenesis inhibitor vasohibin. *Arteriosclerosis, Thrombosis, and Vascular Biology* **2006**, *26*(5), 1051–7.
- Silva, M., Morsci, N., Nguyen, K. C. Q., Rizvi, A., Rongo, C., Hall, D. H., & Barr, M. M. Cell-Specific ??-Tubulin Isotype Regulates Ciliary Microtubule Ultrastructure, Intraflagellar Transport, and Extracellular Vesicle Biology. *Current Biology* 2017, 27(7), 968–980.
- Sirajuddin, M., Rice, L. M., & Vale, R. D. Regulation of microtubule motors by tubulin isotypes and post-translational modifications. *Nature Cell Biology* **2014**, *16*(4), 335–44.
- Sirajuddin, M., Rice, L. M., & Vale, R. D. Regulation of microtubule motors by tubulin isotypes and post-translational modifications. *Nature Cell Biology* **2014**, (January).
- Sironi, Barra, & Arce. The association of tubulin carboxypeptidase activity with microtubules in brain extracts is modulated by phosphorylation/dephosphorylation processes **1997**.
- Skoufias, D. A., Burgess, T. L., & Wilson, L. Spatial and temporal colocalization of the Golgi apparatus and microtubules rich in detyrosinated tubulin. *The Journal of Cell Biology* **1990**, *111*(5 Pt 1), 1929–37.
- Song, W., Cho, Y., Watt, D., & Cavalli, V. Tubulin-tyrosine ligase (TTL)-mediated increase in tyrosinated α-tubulin in injured axons is required for retrograde injury signaling and axon regeneration. *Journal of Biological Chemistry* **2015**, *290*(23), jbc.M114.622753.
- Song, Y., Kirkpatrick, L. L., Schilling, A. B., Helseth, D. L., Chabot, N., Keillor, J. W., ... Brady, S. T. Transglutaminase and polyamination of tubulin: posttranslational modification for stabilizing axonal microtubules. *Neuron* **2013**, *78*(1), 109–23.
- Soucek, K., Kamaid, A., Phung, A. D., Kubala, L., Bulinski, J. C., Harper, R. W., & Eiserich, J. P. Normal and prostate cancer cells display distinct molecular profiles of alpha-tubulin posttranslational modifications. *The Prostate* **2006**, *66*(9), 954–65.
- Steinmetz, M. O., & Akhmanova, A. Capturing protein tails by CAP-Gly domains. *Trends in Biochemical Sciences* **2008**, *33*(October), 535–545.
- Suzuki, Y., Kobayashi, M., Miyashita, H., Ohta, H., Sonoda, H., & Sato, Y. Isolation of a small vasohibinbinding protein (SVBP) and its role in vasohibin secretion **2010**, 3094–3101.
- Szyk, A., Deaconescu, A. M., Piszczek, G., & Roll-Mecak, A. Tubulin tyrosine ligase structure reveals adaptation of an ancient fold to bind and modify tubulin. *Nature Structural & Molecular Biology* **2011**, *18*(11), 1250–1258.
- Takahashi, Y., Koyanagi, T., Suzuki, Y., Saga, Y., & Kanomata, N. Vasohibin-2 Expressed in Human Serous Ovarian Adenocarcinoma Accelerates Tumor Growth by Promoting Angiogenesis **2012**, (10), 1135–1147.
- Takahashi, Y., Koyanagi, T., Suzuki, Y., Saga, Y., Kanomata, N., Moriya, T., ... Sato, Y. Vasohibin-2 expressed in human serous ovarian adenocarcinoma accelerates tumor growth by promoting angiogenesis. *Molecular Cancer Research : MCR* **2012**, *10*(9), 1135–46.

- Takahashi, Y., Saga, Y., Koyanagi, T., Takei, Y., Machida, S., Taneichi, A., ... Fujiwara, H. The angiogenesis regulator vasohibin-1 inhibits ovarian cancer growth and peritoneal dissemination and prolongs host survival. *International Journal of Oncology* **2015**, *47*(6), 2057–63.
- Takahashi, Y., Saga, Y., Koyanagi, T., Takei, Y., Machida, S., Taneichi, A., ... Fujiwara, H. Vasohibin-1 expression inhibits advancement of ovarian cancer producing various angiogenic factors **2016**, *1*.
- Takeda, E., Suzuki, Y., Yamada, T., Katagiri, H., & Sato, Y. Knockout of Vasohibin-1 Gene in Mice Results in Healthy Longevity with Reduced Expression of Insulin Receptor, Insulin Receptor Substrate 1, and Insulin Receptor Substrate 2 in Their White Adipose Tissue **2017**, *2017*.
- Tamaki, K., Moriya, T., Sato, Y., Ishida, T., Maruo, Y., Yoshinaga, K., ... Sasano, H. Vasohibin-1 in human breast carcinoma: a potential negative feedback regulator of angiogenesis. *Cancer Science* **2009**, *100*(1), 88–94.
- Tamaki, K., Sasano, H., Maruo, Y., Takahashi, Y., Miyashita, M., Moriya, T., ... Ohuchi, N. Vasohibin-1 as a potential predictor of aggressive behavior of ductal carcinoma in situ of the breast. *Cancer Science* **2010**, *101*(4), 1051–8.
- Thompson, W. C., Deanin, G. G., & Gordon, M. W. Intact microtubules are required for rapid turnover of carboxyl-terminal tyrosine of a-tubulin in cell cultures Cell Biology : **1979**, *76*(3), 1318–1322.
- Thyberg, J., & Moskalewski, S. Relationship between the Golgi complex and microtubules enriched in detyrosinated or acetylated alpha-tubulin: studies on cells recovering from nocodazole and cells in the terminal phase of cytokinesis. *Cell and Tissue Research* **1993**, *273*(3), 457–66.
- Tilney, L. G., Bryan, J., Bush, D. J., Fujiwara, K., Mooseker, M. S., Murphy, D. B., & Snyder, D. H. Microtubules: evidence for 13 protofilaments. *The Journal of Cell Biology* **1973**, *59*(2 Pt 1), 267– 75.
- Tort, O., Tanco, S., Rocha, C., Bièche, I., Seixas, C., Bosc, C., ... Janke, C. The cytosolic carboxypeptidases CCP2 and CCP3 catalyze posttranslational removal of acidic amino acids. *Molecular Biology of the Cell* **2014**, *25*(19), 3017–27.
- Tu, M., Li, H., Lv, N., Xi, C., Lu, Z., Wei, J., ... Miao, Y. Vasohibin 2 reduces chemosensitivity to gemcitabine in pancreatic cancer cells via Jun proto-oncogene dependent transactivation of ribonucleotide reductase regulatory subunit M2. *Molecular Cancer* **2017**, *16*, 66.
- Tu, M., Lu, C., Lv, N., Wei, J., Lu, Z., Xi, C., ... Miao, Y. Vasohibin 2 promotes human luminal breast cancer angiogenesis in a non-paracrine manner via transcriptional activation of fibroblast growth factor 2. *Cancer Letters* **2016**, *383*, 272–281.
- Vallee, R. B. A taxol-dependent procedure for the isolation of microtubules and microtubuleassociated proteins (MAPs). *The Journal of Cell Biology* **1982**, *92*(2), 435–42.
- Vaughan, K. T., Tynan, S. H., Faulkner, N. E., Echeverri, C. J., & Vallee, R. B. Colocalization of cytoplasmic dynein with dynactin and CLIP-170 at microtubule distal ends. *Journal of Cell Science* **1999**, *112 (Pt 10)*, 1437–47.

- Vértessy, B. G., Orosz, F., Kovács, J., & Ovádi, J. Alternative binding of two sequential glycolytic enzymes to microtubules. Molecular studies in the phosphofructokinase/aldolase/microtubule system. *Journal of Biological Chemistry* **1997**, *272*(41), 25542–25546.
- Villasante, A., Wang, D., Dobner, P., Dolph, P., Lewis, S. A., & Cowan, N. J. Six mouse alpha-tubulin mRNAs encode five distinct isotypes: testis-specific expression of two sister genes. *Molecular* and Cellular Biology **1986**, 6(7), 2409–19.
- Volker, K. W., & Knull, H. R. A glycolytic enzyme binding domain on tubulin. *Archives of Biochemistry and Biophysics* **1997**, *338*(2), 237–243.
- Vu, H. T., Akatsu, H., Hashizume, Y., Setou, M., & Ikegami, K. Increase in α-tubulin modifications in the neuronal processes of hippocampal neurons in both kainic acid-induced epileptic seizure and Alzheimer's disease. *Scientific Reports* **2017**, *7*, 40205.
- Vue, T. Y., Lee, M., Tan, Y. E., Werkhoven, Z., Wang, L., & Nakagawa, Y. Thalamic Control of Neocortical Area Formation in Mice. *Journal of Neuroscience* **2013**, *33*(19), 8442–8453.
- Walker, R. a, Brien, O., Pryer, K., Soboeiro, M. E., Voter, W. a, Erickson, H. P., & Salmon, E. D. Dynamic Instability of Individual Microtubules. *The Journal of Cell Biology* **1988**, *107*(October), 1437– 1448.
- Wang, Q., Tian, X., Zhang, C., & Wang, Q. Upregulation of vasohibin-1 expression with angiogenesis and poor prognosis of hepatocellular carcinoma after curative surgery **2012**, 2727–2736.
- Watanabe, K., Hasegawa, Y., Yamashita, H., Shimizu, K., Ding, Y., Abe, M., ... Sato, Y. Vasohibin as an endothelium-derived negative feedback regulator of angiogenesis **2004**, *114*(7).
- Watanabe, K., Hasegawa, Y., Yamashita, H., Shimizu, K., Ding, Y., Abe, M., ... Sato, Y. Vasohibin as an endothelium-derived negative feedback regulator of angiogenesis. *The Journal of Clinical Investigation* **2004**, *114*(7), 898–907.
- Webster, D. R. Regulation of Post-translationally Modified Microtubule Populations During Neonatal Cardiac Development **1997**, *1761*, 1747–1761.
- Webster, D. R., Modesti, N. M., & Bulinski, J. C. Regulation of cytoplasmic tubulin carboxypeptidase activity during neural and muscle differentiation: characterization using a microtubule-based assay. *Biochemistry* **1992**, *31*(25), 5849–56.
- Webster, D. R., & Oxford, M. C. Regulation of Cytoplasmic Tubulin Carboxypeptidase Activity In Vitro **1996**, *436*(1 996), 424–436.
- Webster, D. R., Wehland, J., Weber, K., & Borisy, G. G. Detyrosination of Alpha Tubulin Does Not Stabilize Microtubules In Vivo **1990**, *111*(July), 113–122.
- Wehland, J., & Weber, K. Turnover of the carboxy-terminal tyrosine of a-tubulin and means of reaching elevated levels of detyrosination in living cells **1987**, (1973), 185–204.
- Wehland, J., Willingham, M. C., & Sandoval, I. V. A rat monoclonal antibody reacting specifically with the tyrosylated form of ??-tubulin. I. Biochemical characterization, effects on microtubule

polymerization in vitro, and microtubule polymerization and organization in vivo. *Journal of Cell Biology* **1983**, *97*(November), 1467–1475.

- Weizetfel, J. C., Argaraña, C. E., Beltramo, D. M., & Barra, H. S. The integrity of tubulin molecule is not required for the activity of tubulin carboxypeptidase. *Biochemical and Biophysical Research Communications* **1989**, *159*(2), 770–6.
- Weizetfel, J. C., Smania, A. M., Barra, H. S., & Argaraña, C. E. A brain protein (P30) that immunoreacts with a polyclonal anti-pancreatic carboxypeptidase A antibody shows properties that are shared with tubulin carboxypeptidase. *Molecular and Cellular Biochemistry* **1997**, *170*(1-2), 139–46.
- Wen, Y., Eng, C. H., Schmoranzer, J., Cabrera-Poch, N., Morris, E. J. S., Chen, M., ... Gundersen, G. G. EB1 and APC bind to mDia to stabilize microtubules downstream of Rho and promote cell migration. *Nature Cell Biology* **2004**, *6*(9), 820–30.
- Whipple, R. a, Cheung, A. M., & Martin, S. S. Detyrosinated microtubule protrusions in suspended mammary epithelial cells promote reattachment. *Experimental Cell Research* **2007**, *313*(7), 1326–36.
- Whipple, R. a, Vitolo, M. I., Boggs, A. E., Charpentier, M. S., Thompson, K., & Martin, S. S.
 Parthenolide and costunolide reduce microtentacles and tumor cell attachment by selectively targeting detyrosinated tubulin independent from NF-κB inhibition. *Breast Cancer Research* 2013, *15*(5), R83.
- Whipple, R. A., Matrone, M. A., Cho, E. H., Balzer, E. M., Vitolo, M. I., Yoon, J. R., ... Martin, S. S. Epithelial-to-mesenchymal transition promotes tubulin detyrosination and microtentacles that enhance endothelial engagement. *Cancer Research* **2010**, *70*(20), 8127–37.
- Witte, H., & Bradke, F. The role of the cytoskeleton during neuronal polarization. *Current Opinion in Neurobiology* **2008**, *18*(5), 479–87.
- Witte, H., Neukirchen, D., & Bradke, F. Microtubule stabilization specifies initial neuronal polarization. *The Journal of Cell Biology* **2008**, *180*(3), 619–32.
- Xue, Gao, W., Sun, B., Xu, Y., Han, B., Wang, F., ... Kondo, Y. Vasohibin 2 is transcriptionally activated and promotes angiogenesis in hepatocellular carcinoma **2013**, (November 2011), 1724–1734.
- Xue, X., Zhang, Y., Zhi, Q., Tu, M., Xu, Y., Sun, J., ... Miao, Y. MiR200-upregulated Vasohibin 2 promotes the malignant transformation of tumors by inducing epithelial-mesenchymal transition in hepatocellular carcinoma **2014**, 1–10.
- Xue, Zhang, Y., Zhi, Q., Tu, M., Xu, Y., Sun, J., ... Gao, W. MiR200-upregulated Vasohibin 2 promotes the malignant transformation of tumors by inducing epithelial-mesenchymal transition in hepatocellular carcinoma. *Cell Communication and Signaling : CCS* **2014**, *12*, 62.
- Yan, Y., Shen, Z., Ye, Y., Jiang, K., Zhang, H., Shen, C., ... Wang, S. A novel molecular marker of prognosis in colorectal cancer: Vasohibin-1. *Medical Oncology (Northwood, London, England)* 2014, 31(2), 816.

- Yang, D., Rismanchi, N., Renvoisé, B., Lippincott-Schwartz, J., Blackstone, C., & Hurley, J. H. Structural basis for midbody targeting of spastin by the ESCRT-III protein CHMP1B. *Nature Structural & Molecular Biology* **2008**, *15*(12), 1278–1286.
- Yoshinaga, K., Ito, K., Moriya, T., Nagase, S., Takano, T., Niikura, H., ... Sato, Y. Expression of vasohibin as a novel endothelium-derived angiogenesis inhibitor in endometrial cancer. *Cancer Science* **2008**, *99*(5), 914–9.
- Yoshinaga, K., Ito, K., Moriya, T., Nagase, S., Takano, T., Niikura, H., ... Sato, Y. in cervical carcinomas **2010**.
- Yu, I., Garnham, C. P., & Roll-Mecak, A. Writing and reading the tubulin code. *Journal of Biological Chemistry* **2015**, *290*(28), 17163–17172.
- Zhang, J., Lesort, M., Guttmann, R. P., & Johnson, G. V. W. Modulation of the in situ activity of tissue transglutaminase by calcium and GTP. *Journal of Biological Chemistry* **1998**, *273*(4), 2288–2295.
- Zhang, T., Yu, T.-T., Zhang, D.-M., Hou, X.-M., Liu, X.-J., Zhao, D., & Shan, L. Vasohibin-1 expression detected by immunohistochemistry correlates with prognosis in non-small cell lung cancer. *Medical Oncology (Northwood, London, England)* **2014**, *31*(5), 963.
- Zhao, G., Yang, Y., Tang, Y., Han, R., & Sun, Y. Reduced expression of vasohibin-1 is associated with clinicopathological features in renal cell carcinoma. *Medical Oncology (Northwood, London, England)* **2012**, *29*(5), 3325–34.
- Zink, S., Grosse, L., Freikamp, A., Bänfer, S., Müksch, F., & Jacob, R. Tubulin detyrosination promotes monolayer formation and apical trafficking in epithelial cells. *Journal of Cell Science* 2012, 125(Pt 24), 5998–6008.

Résumé

Les microtubules sont des polymères dynamiques composés de tubulines alpha et beta qui participent à de nombreuses fonctions cellulaires. Les microtubules subissent différentes modifications posttraductionnelles permettant la diversité de leurs fonctions. Au laboratoire nous nous intéressons particulièrement au cycle de détyrosination/tyrosination de l'alpha tubuline qui fait intervenir la Tubuline CarboxyPeptidase (TCP, inconnue) clive la tyrosine carboxy-terminale codée par la plupart des gènes d'alpha-tubuline et la Tubuline Tyrosine Ligase (TTL) qui ajoute de nouveau cette tyrosine. Malgré l'importance vitale de ces modifications la compréhension du cycle demeure incomplète car l'identité de la TCP est restée jusqu'à présent inconnue.

L'objectif principal du projet de thèse a donc été la mise en place d'un protocole original de purification biochimique de l'activité TCP basée, après trois étapes de purification biochimique, sur l'utilisation d'un inhibiteur irréversible. La vasohibine-1 sera la protéine candidate identifiée en masse spectrométrie. Les tests *in vitro* révèleront que la vasohibine-1 ainsi que son homologue la vasohibine-2, montrent en présence de leur partenaire Small Vasohibin Binding Protein (SVBP) une activité de tyrosine et de phénylalanine carboxypeptidase. La baisse de l'expression des vasohibines dans les neurones induit une large baisse du taux de tubuline détyrosinée associée à un retard critique de la différentiation neuronale. De plus la diminution de l'expression de ces protéines dans les progéniteurs neuronaux d'embryon de souris entraîne un fort délai dans l'établissement des couches corticales soulignant le rôle fondamental des vasohibines lors du développement cérébral. Ces travaux révèlent ainsi pour la première fois l'identité des Tubuline CarboxyPeptidases dont l'activité a été découverte il y a presque 40 ans.

D'autre part, j'ai participé à la mise en évidence de l'existence physiologique de deux nouvelles modifications post-traductionnelles : la tubuline delta-3, une forme neuronale générée par certains membres de la famille de Cytosoliques CarboxyPeptidase et la tubuline beta delta-4 qui semble peu exprimée mais ubiquitaire.

L'ensemble de mes travaux de thèse participent l'étude de la régulation des modifications posttraductionnelles des microtubules et avec la découverte des enzymes TCPs, contribueront à la compréhension de leur implication dans des processus physiologiques tels que la mitose et pathologiques tel que le cancer.

Abstract

Microtubules are dynamic polymers composed of alpha and beta tubulin dimers taking part in a variety of cellular structures and functions in cells. Tubulin undergoes a cycle of detyrosination/tyrosination on the carboxy-terminus of its alpha-subunit and this results in subpopulations of tyrosinated and detyrosinated tubulin within microtubules. This cycle is initiated by the unknown tubulin carboxypeptidase (TCP) that cleaves the C-terminal tyrosine of alpha-tubulin which can be re-added by the Tubulin Tyrosine Ligase (TTL). This cycle is of critical importance as the mice lacking TTL enzyme die within hours showing strong brain defects. However, a complete understanding of the cycle is still lacking as Tubulin CarboxyPeptidase identity remained unknown.

The main objective of the PhD project was the elaboration of an innovative protocol of TCP activity purification which is based on a three-step purification followed by the use of an irreversible inhibitors. Thus, after mass spectrometry analysis of enriched sample we successfully identified brain TCP as vasohibin-1. *In vitro* assays demonstrated that, in the presence of Small Vasohibin Binding Protein (SVBP), VASH1 and its homologue VASH2 exhibit robust tyrosine and phenylalanine carboxypeptidase activity on microtubules. Neuronal vasohibins or SVBP down-regulation induces a large reduction of detyrosinated tubulin levels associated with severe neuronal differentiation defects of neurons. Moreover, down regulation of these proteins in neuronal progenitors generate of mouse embryo a critical delay in cortical layer establishment underlying a crucial role of vasohibins activity for brain physiology. For the first time in 40 years, these results clearly establish vasohibin/SVBP complexes as TCP enzymes.

Moreover, I participate in the discovery of a two new physiological post-translational modifications, delta-3 alpha tubulin which is specific to neurons and generated by well known members of the Cytosolic CarboxyPeptidase family (CCPs), and delta-4 beta tubulin which is weakly expressed but ubiquitous.

Overall, these data participate in the deciphering the role of tubulin post-translational modification role in the functional regulation of microtubules and will contribute to the understanding of their implications in physiological and pathological processes such as mitosis or tumorigenesis.