



HAL
open science

Caractérisation du rôle de CRMP4 dans la signalisation sémaphorine 3E et le développement du fornix

Charlotte Ravanello

► **To cite this version:**

Charlotte Ravanello. Caractérisation du rôle de CRMP4 dans la signalisation sémaphorine 3E et le développement du fornix. Neurosciences [q-bio.NC]. Université Grenoble Alpes [2020-..], 2021. Français. NNT: 2021GRALV051 . tel-03596687

HAL Id: tel-03596687

<https://theses.hal.science/tel-03596687>

Submitted on 3 Mar 2022

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

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

THÈSE

Pour obtenir le grade de

DOCTEUR DE L'UNIVERSITE GRENOBLE ALPES

Spécialité : **Neurobiologie/Neurosciences**

Arrêté ministériel : 25 mai 2016

Présentée par

Charlotte RAVANELLO

Thèse dirigée par **Jean-Christophe DELOULME**

préparée au sein du **Grenoble Institut des Neurosciences**,
équipe « Physiopathologie du cytosquelette »
dirigée par Annie Andrieux

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

Caractérisation du rôle de CRMP4 dans la signalisation séphorine 3E et le développement du fornix

Thèse soutenue publiquement le **19 octobre 2021**,

devant le jury composé de :

Madame Fanny MANN

Directrice de recherche, Institut de Biologie du Développement de
Marseille, Luminy (rapporteur)

Monsieur Xavier NICOL

Directeur de recherche, Institut de la vision, Paris (rapporteur)

Madame Chloé DOMINICI

Docteur en Neurosciences, Institute for Research on Cancer and Aging, Nice
(examineur)

Monsieur Alain BUISSON

Professeur, Université Grenoble Alpes, Grenoble (président)



Remerciements

Je tiens tout d'abord à remercier les membres du jury, Fanny Mann, Xavier Nicol, Chloé Dominici et Alain Buisson d'avoir bien voulu examiner mes travaux. Je remercie Annie Andrieux pour m'avoir permis de réaliser ma thèse dans son équipe, ainsi qu'Isabelle Arnal d'avoir fait en sorte que je la termine dans de bonnes conditions. Je tiens évidemment à remercier mon directeur de thèse, Jean-Christophe Deloulme (« Toff ») pour tout ce qu'il m'a appris et apporté pendant ces 4 années, sur un plan scientifique mais pas seulement ! Je remercie Benoît Boulan, qui a commencé ce travail au cours de son doctorat, pour m'avoir formée à mon arrivée au laboratoire et motivée à faire une thèse à mon tour. Je tiens à remercier Amandine Peyrel, qui a réalisé ses stages de L3 et de Master 1 au sein de l'équipe, pour son travail et son implication dans ce projet. Je souhaite remercier également tous les membres de l'équipe d'Annie, Sylvie Gory-Fauré, Eric Denarier, Christophe Bosc, Christian Delphin, Lisa De Macedo, Camille Cuveillier, Frédéric Vossier, Nicolas Chaumontel, Yves Golberg, Leticia Peris, Marie-Jo Moutin et Jean-Marc Soleillac pour leur disponibilité et leur aide. Enfin je remercie les membres de mon comité de suivi individuel Sophie Chauvet, Yves Golberg et Muriel Jacquier-Sarlin pour leurs conseils avisés sur l'avancée et l'orientation de mon projet.

Abréviations

Actine-G: actine globulaire
Actine-F: actine filamenteuse
Akt: Protein Kinase B
Amyloïde-béata: A β
APC: Adenomatous Polyposis Coli
ARP: Actin-Related Proteins
BDNF: Brain Derived Neurotrophic Factor
BMP: Bone Morphogenic Protein
CA1/3: Cornu Ammonis 1/3
CAM: Cell Adhesion Molecule
CaMKII: Ca²⁺/calmoduline dependent kinase II
CaV: Voltage-gated calcium channel
CBD: CaV Binding Domains
CLASP: Cytoplasmic linker associated protein 1
CRMP: Collapsin Response Mediator Protein
CSPGs: Chondroitin Sulfate Proteoglycans
CTNF: Ciliary Neurotrophic Factor
CXCL12: C-X-C motif chemokine 12
Dab1: Disabled-1
DAT: Dopamine Active Transporter 7
DCC: Deleted in Colorectal Carcinomas
DISC1: Disrupted-in-schizophrenia 1
DHPase: dihydropyrimidinase
DRG: Dorsal Root Ganglia
DsCAM: Down syndrome Cell Adhesion Molecule
DTI: Diffusion Tensor Imaging
DYRK2: Dual Tyrosine-Regulated Kinase 2
EB1, 3: Microtubule-associated protein RP/EB family member 1, 3
Fes: FES proto-oncogene, tyrosine kinase
FARP: FERM domain-containing guanine nucleotide exchange factor (GEF)
Fyn: Proto-oncogene tyrosine-protein kinase Fyn
GAP: GTPases-Activating Proteins
GDNF: Glial cell ligne-Derived Neurotrophic factor
GEF: Guanine Exchange Factors
GFP: Green Fluorescent Protein
GIPC1: GIPC PDZ domain containing family, member 1
GLO1: Glyoxalase 1
GM: Ganglioside Mono acide sialique
GPCR: G protein-coupled receptors
GPI: Glycosyl-Phosphatidyl-Inositol
GSK3 β : Glycogen Synthase Kinase 3 β
HEK: Human embryonic kidney
iPSC: Induced pluripotent stem cells
IRM: Imagerie par Résonance Magnétique
ITSN1: Intersectin 1
kD: kilo Dalton
KD: Knock Down

KI: Knock In
 Kif: Kinesin Family Member
 KO: Knock Out
 LIMK1: LIM Motif-Containing Protein Kinase 1
 LTP: Long Term Potentiation
 MAG: Myelin-Associated Glycoprotein
 MAI: Myelin Associated Inhibitor
 MAP: Microtubule Associated Protein
 mcht: medial cortico-hypothalamic tract
 MLCK: Myosin Light Channel Kinase
 MM: corps mamillaires
 MT: Microtubules
 NaV: Voltage-gated sodium channel
 NCAM: Neural Adhesion Cell molecule
 NGF: Nerve Growth Factor
 NgR: Nogo Receptor
 NLS: Nuclear Localisation Sequence
 NMDA: N-methyl-D-aspartate
 Nogo: Neurite outgrowth inhibitor protein
 NR2B (N-methyl-D-aspartate Receptor Subunit 2B)
 Nrp: Neuropiline
 PC12: pheochromocytoma 12
 PI3K: PhosphoInositide 3 kinase 9
 Plx: Plexine
 PP2A : Protéine Phosphatase 2A
 PPT1 : Palmitoyl Protein Thioesterase
 PTEN: Phosphatase and TENsin homolog
 Rac1: Ras-related C3 botulinum toxin substrate 1
 RhoA: Ras homolog gene family member A
 Rho GTPases: Ras homologous guanosine triphosphate binding protein
 Rln: Reelin
 Robo: Roundabout
 ROCK: Rho-associated kinase
 Sema: Sémaphorine
 Shh: Sonic hedgehog
 SH3: Srk Homology 3
 SNARE: Soluble N-éthylmaleimide-sensitive-factor Attachment protein Receptor
 SNC: Système Nerveux Central
 SNP: Système Nerveux Périphérique
 Sra1: Specifically, Rac1-associated protein 1
 Sra1/WAVE1: Rac1-associated protein 1 (Sra-1) /WASP family verprolin-homologous protein 1
 SV2: Synaptic Vesicle protein 2
 +TIPs: positive end-Tracking Protein
 TrkB: Tyrosine Receptor Kinase B
 TOAD-64: Turn On After Division - 64kD
 TSA: Troubles du Spectre de l'Autisme
 UNC: Uncoordinated phenotype
 VEGFR2: Vascular Endothelial Growth Factor Receptor 2
 WASP: Wiskott-Aldrich syndrome family protein

WAVE: WASP-family verprolin-homologous protein

WT: Wild Type

Yes: Proto-oncogene tyrosine-protein kinase Yes

3T3: 3-day transfer, inoculum 3×10^5 cells

Table des matières

Contexte et objectifs de la thèse	11
Introduction	13
I. Le développement embryonnaire du système nerveux dans les grandes lignes.....	14
II. Les mécanismes et acteurs impliqués dans le guidage et la croissance axonale	15
II. 1. L'architecture du cône de croissance et les mécanismes à la base de sa motilité	15
II. 2. L'élongation axonale, une question de forces	19
II. 3. Le rôle du cytosquelette et des protéines qui lui sont associées dans les phénomènes de guidage et de croissance axonale	20
II. 3. 1. L'actine et les protéines qui régulent sa dynamique	20
II. 3. 2. Le rôle des microtubules et des protéines qui leurs sont associées	22
II. 4. Les molécules de guidage et leurs récepteurs	25
II. 4. 1. Molécules d'adhérence cellulaires	25
II. 4. 2. Facteurs neurotrophiques et morphogènes	26
II. 4. 3. Nétrines et draxine.....	27
II. 4. 4. Ephrines.....	28
II. 4. 5. Slits.....	29
II. 4. 6. Sémaphorines	29
III. sémaphorine 3A et sémaphorine 3E	31
II. 1. La sémaphorine 3A, première voie de signalisation dans laquelle une CRMP a été caractérisée.....	31
II. 2. La sémaphorine 3E.....	33
II. 2. 1. Rôle de la sémaphorine 3E dans la connectivité neuronale	33
II. 2. 2. La sémaphorine 3E, une molécule de guidage bi-fonctionnelle.....	35
II. 3. Le fornix, un exemple de l'implication de la Sema3E dans l'établissement des connectivités neuronales	36
II. 3. 1. Le subiculum, une structure appartenant à la formation hippocampique.....	36
II. 3. 2. Le fornix	37
II. 3. 2. 1. Neuroanatomie.....	37
II. 3. 2. 2. Les effecteurs contrôlant le développement du fornix post-commissural	38

L'invalidation de la draxine et de la sémaphorine 6A induit des défauts de fornix post-commissural.....	38
La Sema3E une molécule de guidage essentielle au développement du fornix post-commissural.....	39
MAP6, un effecteur intracellulaire nécessaire à la croissance du fornix post-commissural médiée par la Sema3E	39
II. 3 .2 .3. Fonction du fornix et ses altérations dans les pathologies du cerveau .	42
Rôle du fornix	42
Implication dans des pathologies neurodégénératives et psychiatriques.....	43
La souris MAP6 KO, un modèle d'étude de pathologies psychiatriques	44
IV. La famille des Collapsin Response Mediator Proteins (CRMP)	45
IV. 1. Vue d'ensemble des CRMP	45
IV. 2. Gènes et épissage	45
IV. 3. Modifications post-traductionnelles	47
IV. 3. 1. Phosphorylation	47
IV. 3. 2. O-GlcNAcylation.....	48
IV. 3. 3. SUMOylation.....	48
IV. 3. 4. Palmitoylation	49
IV. 3. 5. Protéolyse.....	49
IV. 4. Rôles des CRMP.....	50
IV. 4. 1. Expression tissulaire	50
IV. 4. 1. 1. Dans le système nerveux	50
IV. 4. 1. 2. Dans les autres tissus.....	51
IV. 4. 2. Les CRMP dans la croissance neuritique et la régénération.....	52
IV. 4. 2. 1. Interaction avec le cytosquelette	52
Microtubules	52
Actine.....	54
IV. 4. 2. 2. Croissance axonale.....	54
IV. 4. 2. 3. Croissance axonale et molécules de guidage	55
IV. 4. 2. 4. Croissance dendritique	56
IV. 4. 2. 5. Liens fonctionnels entre les CRMP dans les mécanismes de régulation de la croissance neuritique.....	58

IV. 4. 2. 6. Régénération axonale	62
IV. 4. 2. 7. Les CRMP et la régulation des courants ioniques	65
IV. 4. 2. 8. Les CRMP et le transport axonal	68
IV. 4. 2. 9. Les CRMP dans différentes pathologies cérébrales.....	69
Schizophrénie	69
Autisme.....	70
Maladie d'Alzheimer	70
V. Radeaux lipidiques.....	72
V. 1. Les membranes lipidiques : le concept de mosaïque fluide et l'existence de microdomaines	72
V. 2. Les radeaux lipidiques : définition et évolution du concept	73
V. 2. 1 Composition des radeaux lipidiques	73
V. 2. 1. 1. Les sphingolipides	73
V. 2. 1. 2. Le cholestérol	73
V. 2. 2. Vers une définition plus précise des radeaux lipidiques	74
V. 2. 3. Les cavéoles, des radeaux lipidiques particuliers.....	75
V. 3. Mise en évidence et isolement des microdomaines membranaires.....	76
V. 3. 1. Méthodes utilisant des détergents	76
V. 3. 2. Méthodes utilisant la déplétion du cholestérol.....	77
V. 3. 3. Etude des radeaux lipidiques dans des membranes de cellules intactes	77
V. 4. Rôles des radeaux lipidiques dans différents mécanismes cellulaires	78
V. 4. 1. Radeaux lipidiques et trafic intracellulaire du Golgi à la membrane plasmique	79
V. 4. 2. Radeaux lipidiques et transmission synaptique.....	79
V. 4. 3. Radeaux lipidiques et croissance/guidage axonal	81
V. 4. 3. 1. Survie et Régénération	81
V. 4. 3. 2. Guidage et croissance axonale.....	82
V. 4. 3. 3. Adhérence cellulaire	83
V. 4. 3. 4. Cytosquelette	84
V. 4. 3. 5. Radeaux lipidiques et protéines d'intérêt	85
V. 5. Controverse	86
VI. Résumé du projet.....	87
Résultats	90

Article 1	91
Article 2	135
Discussion et perspectives.....	152
Les CRMP, fonctions partagées et rôles propres à une isoforme	154
CRMP4, une protéine impliquée dans des voies attractives mais qui pourrait aussi être un acteur de signalisations répulsives?	155
DRM/radeaux lipidiques, une définition encore sujette à controverse du fait de la difficulté à visualiser ces structures in situ	157
La phosphorylation de CRMP4, un moyen de réguler sa localisation?.....	158
MAP6 dans la signalisation Sema3E, une interaction fonctionnelle avec CRMP4?	159
Références	163
Annexe	211
Article 3	211

Contexte et objectifs de la thèse

L'équipe d'Annie Andrieux qui m'a accueillie au cours de ma thèse s'intéressait à la physiopathologie du cytosquelette et aux protéines qui régulent celui-ci comme les MAP (Microtubules associated protein) et en particulier MAP6. Cette protéine, qui est capable de lier et stabiliser les microtubules mais également d'interagir avec l'actine, a fait l'objet de nombreuses études allant de la caractérisation de son rôle *in vitro* à l'étude de ses fonctions chez l'animal. La génération d'une souris invalidée pour le gène codant pour MAP6 (MAP6 KO) a permis d'impliquer cette protéine dans la formation d'une structure en particulier, le fornix post-commissural. Le fornix post-commissural correspond à un tract composé d'un ensemble d'axones de neurones du subiculum, appartenant à la formation hippocampique, qui projettent principalement dans les corps mamillaires de l'hypothalamus. Le fornix fait partie du système limbique et en particulier du circuit de Papez impliqué dans la mémoire, la gestion des émotions et de la personnalité ainsi que dans la navigation. Les souris MAP6 KO présentent une absence de développement quasi-complète du fornix post-commissural. L'altération de l'intégrité de cette structure a été associée à des troubles psychiatriques ainsi qu'à des maladies neurodégénératives chez l'homme et peut être mise en lien avec les défauts de comportement et de mémoire observés chez la souris MAP6 KO. Le développement du fornix post-commissural se fait sous le contrôle de la sémaphorine 3E (Sema3E), une molécule de guidage, qui exerce un effet attractif sur les neurones du subiculum. Notre laboratoire a montré que MAP6 jouait un rôle crucial dans la signalisation Sema3E mais qu'étonnamment ce rôle n'était pas lié à sa capacité à stabiliser les microtubules. Le but de l'étude, commencée par Benoit Boulan au cours de sa thèse, était d'identifier des partenaires potentiels de MAP6 dans la signalisation Sema3E pour mieux caractériser les acteurs mis en jeu au cours du développement du fornix. Une étude en spectrométrie de masse a permis d'identifier CRMP (collapsin response mediator protein) 1, CRMP2 et CRMP4 comme interagissant avec MAP6. Ces protéines sont connues pour être impliquées dans la signalisation sémaphorine 3A, dans laquelle elles régulent, entre autres, la croissance neuritique à travers leur capacité à agir sur le cytosquelette. Benoit Boulan avait montré que seule CRMP4, parmi ces trois CRMP, jouait un rôle dans la stimulation de la croissance axonale des neurones du subiculum en présence de Sema3E et que les souris CRMP4 KO présentaient elles aussi une altération de développement du fornix. Au cours de ma thèse je me suis donc attachée à étudier le rôle de CRMP4 dans cette voie de

signalisation ainsi que dans la mise en place du fornix et à comprendre les mécanismes cellulaires nécessaires à son action sur la croissance axonale.

Introduction

I. Le développement embryonnaire du système nerveux dans les grandes lignes

Différents acteurs prennent part aux mécanismes complexes conduisant à la création des cellules qui vont constituer le cerveau et à leur organisation les unes par rapport aux autres, et aboutissant *in fine* à des réseaux spécifiques permettant des fonctions cérébrales précises. La mise en place progressive du système nerveux commence très tôt au cours du développement embryonnaire lors de l'étape de gastrulation durant laquelle à partir d'une couche de cellules précurseurs, 3 feuillets, l'ectoderme, le mésoderme et l'endoderme vont se former. Cette étape est cruciale pour l'apparition d'axes fondamentaux déterminant la position des futurs organes, des membres, de la structure de la face et des systèmes nerveux centraux et périphériques. Vient ensuite l'étape de neurulation au cours de laquelle une fraction des cellules ectodermiques va former la plaque neurale qui s'invaginera pour donner le tube neural. Les cellules souches multipotentes de ce tube neural donneront naissance aux neurones mais aussi aux cellules gliales qui constitueront le cerveau, la moelle épinière et le système nerveux périphérique. La différenciation de ces cellules souches est dépendante de l'environnement dans lequel elles vont évoluer, celui agissant sur la régulation de facteurs intrinsèques, et en particulier sur des facteurs de transcription, qui vont activer l'expression de gènes spécifiques. Le développement des neurones à proprement parler est appelé neurogénèse et c'est au cours de ce processus que certains des précurseurs issus du tube neural vont donner dans un premier temps des neuroblastes. Ces neuroblastes vont migrer le long de la glie radiaire, composée de cellules gliales et venir commencer à former les différentes structures telles que le cortex, l'hippocampe ou le cervelet. Bien que présentés comme ayant lieu de manière séquentielle, ces processus de division des cellules souches multipotentes, de différenciation de certaines en neuroblastes ou en cellules gliales ainsi que les phénomènes de migration, peuvent se faire en parallèle. Une fois leur migration terminée, les neuroblastes, qui sont dans un état post-mitotique, vont se polariser. Les constituants cellulaires que sont le cytosquelette, composé principalement d'actine et de microtubules, mais aussi différentes protéines vont se répartir au sein des neurites de sorte à faire se distinguer un prolongement en particulier l'axone, les autres devenant des dendrites. Cet axone va croître grâce, entre autres, à la structure particulière retrouvée à son extrémité qu'est le cône de croissance. Ce cône de croissance va servir au neurone de senseur de l'environnement en étant capable de détecter la présence de molécules aux propriétés particulières sur son chemin. La rencontre avec ces molécules va orienter l'avancée du cône de

croissance et l'allongement de l'axone via l'induction de cascades de signalisation intracellulaires aboutissant à une réorganisation du cytosquelette et de ses partenaires. Ce phénomène en particulier fera l'objet d'un développement plus approfondi dans la suite de cette introduction. L'axone et le cône de croissance vont permettre aux neurones d'interagir entre eux en formant des synapses au cours de la phase de synaptogénèse. Certaines de ces synapses vont devenir fonctionnelles et seront le lieu de la communication interneuronale, d'autres en revanche, qui resteront inactives, engendreront un phénomène de mort neuronale. Ce mécanisme est appelé élagage ou « pruning » et permet de supprimer une partie des neurones produits au cours de la neurogénèse pour ne garder que les neurones actifs dont les connexions, suite à cet élagage, vont se renforcer et se spécifier (d'après Neurosciences 6^{ème} édition Purves, Augustine et Fitzpatrick).

II. Les mécanismes et acteurs impliqués dans le guidage et la croissance axonale

Un des enjeux des neurosciences est de comprendre comment les milliards de neurones qui constituent le cerveau parviennent à s'orienter au cours de leur croissance pour établir ensuite des connexions, parfois à travers des distances relativement importantes, avec des cibles spécifiques, un phénomène à la base de la création de réseaux neuronaux fonctionnels. Pour cela, plusieurs acteurs et mécanismes ont déjà été identifiés. Dans un premier temps nous décrirons rapidement la morphologie d'un cône de croissance et son comportement lors de sa rencontre avec un substrat, ainsi que le processus d'élongation axonale. Nous approfondirons ensuite le rôle du cytosquelette neuronal, une composante essentielle du cône de croissance et des axones, et des protéines qui lui sont associées. Enfin nous nous focaliserons sur les molécules de guidage qui vont, via les récepteurs exprimés à la surface des neurones, induire des cascades de signalisation conduisant au remodelage du cytosquelette.

II. 1. L'architecture du cône de croissance et les mécanismes à la base de sa motilité

Les propriétés motiles du cône de croissance lui permettent d'explorer l'environnement extracellulaire et d'orienter l'allongement des axones dans une direction précise. *In vitro*, le cône de croissance se caractérise par une expansion relativement plane, terminée par des filopodes et se distingue du reste de l'axone à travers une organisation du cytosquelette particulière (Figure 1). Le domaine périphérique (domaine P) contient des réseaux d'actine filamenteuse (actine-F) ramifiés formant un maillage et conférant à cette zone une morphologie de type lamellipode dont partent les filopodes, composés eux de longs filaments d'actine-F arrangés en faisceaux. Quelques microtubules individuels très dynamiques explorent également cette région, généralement le long des faisceaux d'actine-F. Le domaine central (domaine C) renferme des microtubules stables et groupés qui pénètrent dans le cône de croissance à partir de l'axone. Enfin, à l'interface entre les domaines P et C, il existe une région de transition appelée zone T, enrichie en myosine II qui va se complexer à l'actine pour former l'actomyosine, permettant via ses propriétés contractiles, d'attirer le domaine C dans une direction donnée (Figure 1 et 2) (Lowery and Van Vactor, 2009; Ye et al., 2019).

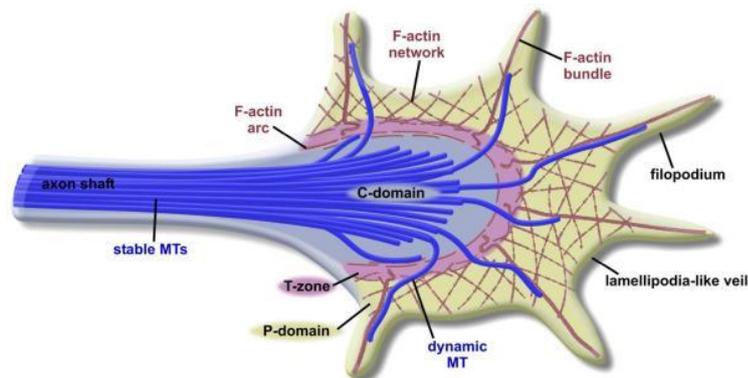


Figure 1 : Représentation schématique d'un cône de croissance d'après Lowery and Van Vactor, 2009

La motilité du cône de croissance s'effectue selon un mécanisme précis répondant à une modification de l'équilibre des forces qui s'exercent entre les différents constituants du cône de croissance (Franze, 2020). En effet, les filaments d'actine présentent une polarité intrinsèque, se polymérisant préférentiellement par l'ajout d'actine liée à l'ATP à l'extrémité plus, et se dépolymérisant par la perte des sous-unités d'actine globulaire (actine-G) liées à l'ADP à l'extrémité moins. La nature polarisée de l'assemblage et du désassemblage de l'actine maintient une longueur constante de filament, les sous-unités d'actine individuelles étant ajoutées et retirées à un rythme égal. En présence d'un substrat adhésif, un contact ponctuel va s'effectuer

entre le cytosquelette d'actine et la matrice extracellulaire (Figure 2A et Figure 3B) (Lowery and Van Vactor, 2009). Ce contact a lieu via des protéines adaptatrices telles que les molécules d'adhésion cellulaire (CAM) et notamment les intégrines, la vinculine, la shootine1 et la cortactine (Case and Waterman, 2015; Y. Kubo et al., 2015; Suter et al., 1998). Cet ancrage va bloquer le flux rétrograde des monomères d'actine-G à partir de l'extrémité plus du filament, favoriser l'allongement de ce filament et conduire à la protrusion du filopode (Figure 3B). En parallèle, des microtubules vont venir explorer le domaine P (Figure 3C). Comme les filaments d'actine, les microtubules sont des structures polarisées avec l'addition à leur extrémité positive de dimères de tubuline, la majorité des microtubules ayant leurs extrémités plus orientées vers la terminaison axonale (Baas et al., 1988; Wai Yau et al., 2016). Lorsque ceux-ci sont dans une phase d'avancée, les microtubules forment un réseau dynamique, évasé en forme d'éventail partant du domaine central et qui s'étend jusqu'au domaine périphérique en se servant des filaments d'actine-F comme de guides pour orienter et freiner leur progression (Figure 3C) (Burnette et al., 2007; Conde and Cáceres, 2009; Tanaka & Kirschner, 1991). Ces mécanismes s'accompagnent d'un élargissement de la zone T dû à la dépolymérisation des filaments d'actine à leur extrémité moins (Figure 2B).

Suite à cette étape de protrusion vient une phase d'engorgement au cours de laquelle la polymérisation des microtubules, guidée par les bundles d'actine du domaine C et contenue par les arcs d'actine de la zone T, va leur permettre de remplir le domaine C (Figure 2C et Figure 3D) (A. W. Schaefer et al., 2008). Durant la dernière étape appelée consolidation, la myosine II va exercer une force de traction sur les filaments d'actine qui polymérisent et poussent la membrane en direction du substrat, ainsi que sur les microtubules de du domaine C, induisant l'avancée du cône de croissance (Figure 2D) (Lowery and Van Vactor, 2009).

Si la rencontre entre un substrat attractif et le cône de croissance conduit à la progression de celui-ci et à l'allongement de l'axone, à l'inverse, la présence de constituants répulsifs induit un phénomène de collapse. Cet effondrement du cône de croissance est caractérisé par la disparition des filopodes et la perte d'activité de protrusion du domaine P. Ce mécanisme est dû à une réorganisation des filaments d'actine-F qui dépolymérisent et s'accompagne d'un détachement du cône de croissance du substrat (Gallo & Letourneau, 2004).

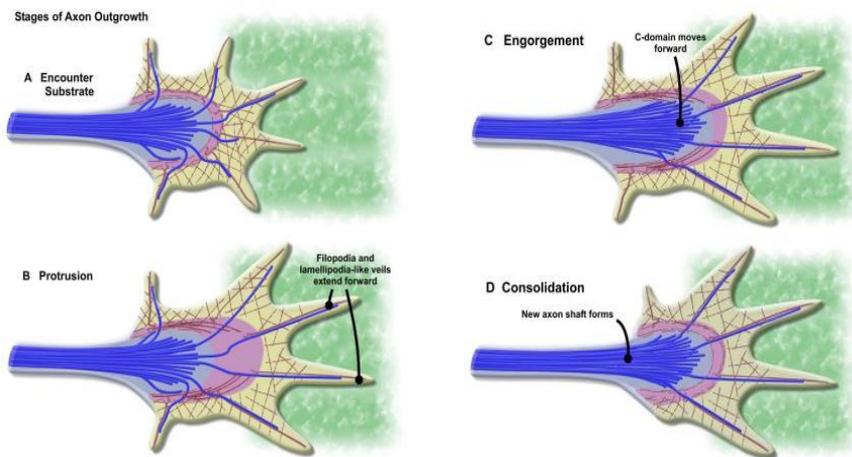


Figure 2 : Représentation schématique des différentes étapes induites par la rencontre du cône de croissance avec un substrat adhésif d'après Lowery and Van Vactor, 2009

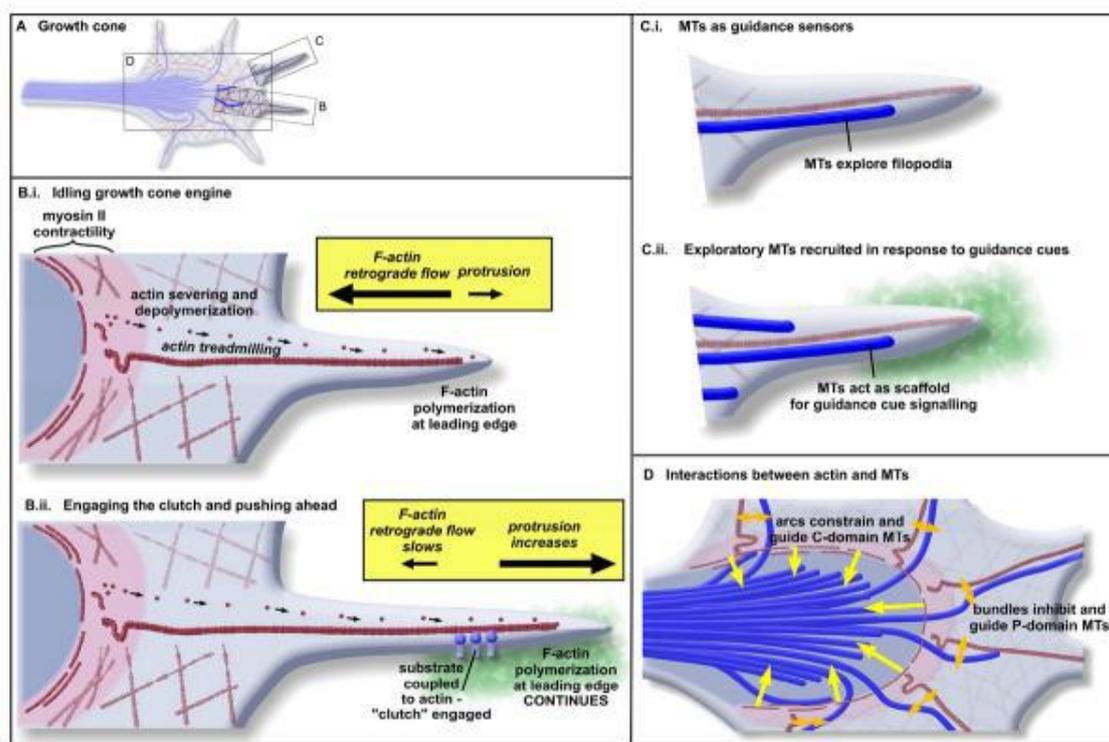
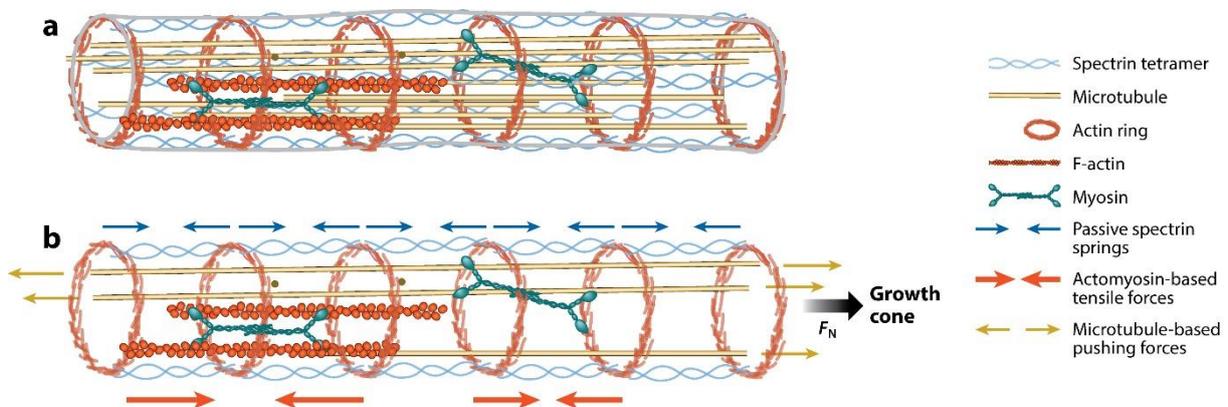


Figure 3 : Représentation schématique du rôle joué par les constituants du cytosquelette dans la motilité du cône de croissance lors de la rencontre avec un substrat adhésif d'après Lowery and Van Vactor, 2009

II. 2. L'élongation axonale, une question de forces

Lorsque le cône de croissance est en mouvement, la force déployée par celui-ci devient supérieure à celle exercée par les composants de l'axone entre eux. Dans les axones, l'actine est disposée en un motif régulier d'anneaux entourant les microtubules qui sont eux-mêmes espacés par des tétramères de spectrine (K. Xu et al., 2013). De l'actine sous forme de filaments ainsi que de la myosine II sont également présentes (Figure 4a) (Fan et al., 2017). Les forces sont à l'équilibre au niveau de l'axone lorsque celle exercée à l'extrémité par le cône de croissance et celle à l'intérieur de l'axone résultant de la dynamique des microtubules (qui polymérisent et dépolymérisent) et de l'actomyosine se compensent. La traction exercée par le cône de croissance dès lors que celui-ci progresse, crée un déséquilibre des forces, induit un "étirement" de la membrane de l'axone et l'apparition d'espace dans lesquels les microtubules vont pouvoir polymériser et progresser jusqu'au niveau du domaine C du cône de croissance (Figure 4b) (Franze, 2020). Un nouveau segment d'axone est ainsi créé à la base du cône de croissance à l'intérieur duquel les microtubules compactés vont être ensuite stabilisés par des protéines spécialisées.



Franze K, 2020.
Annu. Rev. Cell Dev. Biol. 36:61-83

Figure 4 : Représentation schématique des constituants cytosquelettiques de l'axone et des forces mises en jeu au cours de l'élongation d'après Franze, 2020

II. 3. Le rôle du cytosquelette et des protéines qui lui sont associées dans les phénomènes de guidage et de croissance axonale

Comme cela vient d'être décrit, la motilité du cône de croissance et l'allongement de l'axone sont permis par une organisation particulière du cytosquelette à l'intérieur de ces structures. De nombreuses protéines vont être recrutées pour organiser à différents niveaux ce cytosquelette constitué d'actine et de microtubules et réguler leurs dynamiques, nécessaire au changement de morphologie imposé par l'avancée du cône de croissance et de l'axone.

II. 3. 1. L'actine et les protéines qui régulent sa dynamique

Le complexe Arp2/3, qui est enrichi dans le domaine P, fixe des filaments d'actine existants pour nucléer à partir d'eux, les filaments d'actine ramifiés qui donnent leur structure aux lamellipodes. Les formines, elles, nucléent et allongent mais de manière non ramifiée, les filaments d'actine responsables de la morphologie oblongue des filopodes (Block et al., 2012). Il existe également des protéines de la famille des Ena/VASP (Enabled/vasolidator-stimulated phosphoprotein) qui favorisent la polymérisation de l'actine en se liant à l'extrémité plus du filament (Drees & Gertler, 2008). La motilité de ce cône de croissance implique une forte dynamique de l'actine passant par un renouvellement rapide des filaments existants. La dépolymérisation de ces filaments est en partie médiée par le biais de la famille des ADF (Actin depolymerizing factor) /Cofiline. Ces protéines ont été initialement identifiées pour leur capacité à augmenter le taux de dissociation de l'actine à l'extrémité moins ainsi que pour leur habilité à séparer les filaments d'actine en petits fragments (Carlier et al., 1997; Maciver, 1998). Ces petits fragments d'actine générés peuvent ensuite être recyclés et récupérés par d'autres protéines comme la profiline qui se lie à l'actine-G et la délivre à l'extrémité plus en croissance pour poursuivre l'assemblage des filaments. La dépolymérisation de l'actine induite par les ADF/Cofiline conduisant au désassemblage de l'actine-F va également créer de nouvelles extrémités plus à partir desquelles la polymérisation pourra avoir lieu (Kuhn et al., 2000; Pollard et al., 2000). C'est probablement de part cette capacité à induire une dépolymérisation mais également, de manière indirecte, à favoriser à nouveau l'assemblage de l'actine, que ces protéines ont été retrouvées impliquées à la fois dans la motilité mais aussi dans l'effondrement du cône de croissance (Bradke & Dotti, 1999; Hsieh et al., 2006; Meberg et al., 1998; Piper et al., 2006). D'autres protéines, comme la famille des Rho GTPases, jouent un rôle crucial dans le remodelage du cytosquelette d'actine, en agissant via la médiation de signalisations

complexes, induites par des molécules de guidage (voir II. 4.) sur les effecteurs directs de l'actine qui viennent d'être cités (Figure 5). RhoA est associé majoritairement à une signalisation inhibitrice de la motilité des cônes de croissance, tandis que Rac1 et Cdc42 sont principalement des effecteurs en aval des signaux attractifs et favorisant la croissance (A. Hall & Lalli, 2010). RhoA agit par l'intermédiaire de la kinase ROCK, qui peut à son tour réguler plusieurs cibles en aval. ROCK phosphoryle et active la LIMK1, qui va ensuite phosphoryler et inactiver la cofiline, bloquant la dépolymérisation (Figure 5). Cette voie a été décrite dans l'inhibition des cônes de croissance par plusieurs signaux répulsifs (Aizawa et al., 2001; Marsick et al., 2012). ROCK en parallèle, via la kinase MLCK (Myosin Light Channel Kinase) et la myosine II va induire la contractilité de l'actomyosine et inhiber l'extension du cône de croissance (Amano et al., 1998; T. Kubo et al., 2008). Rac1 et Cdc42 quant à eux régulent Arp2/3, permettant la nucléation et la polymérisation de l'actine (Goley and Welsch, 2006). Rac1 pourrait également agir sur les protéines Ena/VASP (Figure 5) (S. B. Jones et al., 2004). De la même manière que des rôles a priori antagonistes ont été associés aux acteurs directs de la régulation du cytosquelette d'actine, contribuant soit à la motilité du cône de croissance soit à sa collapse, la localisation spatio-temporelle d'effecteurs comme Rac1 peut aussi contribuer à ce qu'ils aient des effets opposés sur le cytosquelette d'actine suivant leur contexte d'activation (Omotade et al., 2017). D'autres protéines comme les CRMP (Collapsin Response Mediator Proteins) sont également des substrats de ROCK et l'isoforme CRMP4 est également capable d'interagir avec RhoA (Alabed et al., 2010; Arimura et al., 2005). Les CRMP possèdent aussi la capacité de lier directement à l'actine et de moduler sa dynamique. CRMP4 a été décrite *in vitro* comme jouant un rôle dans la formation de filaments d'actine F et *in vivo* dans la morphologie du cône de croissance au niveau du domaine P, son absence induisant des modifications de l'organisation des filopodes et des lamellipodes (Khazaei et al., 2014; Rosslenbroich et al., 2005; M. Tan et al., 2015; Yu-Kemp & Briher, 2016). L'inhibition de l'activité des CRMP au niveau du cône de croissance engendre une diminution de la taille du cône de croissance ainsi que le changement de l'orientation de celui-ci sur un substrat (Higurashi et al., 2012).

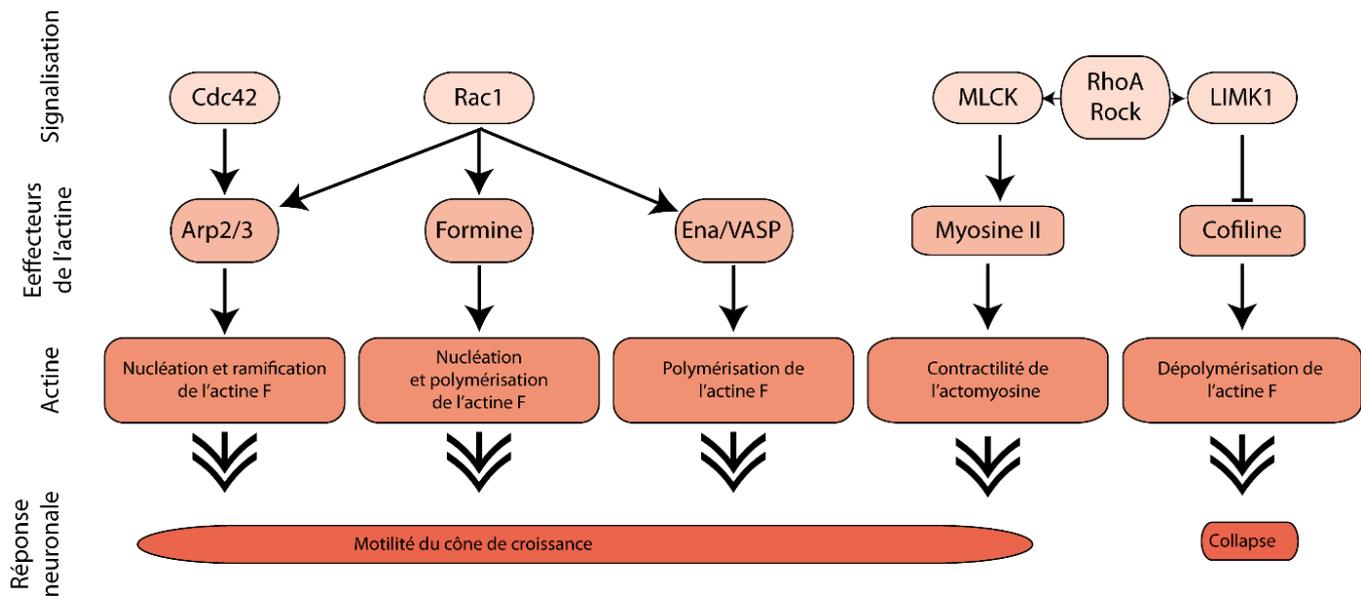


Figure 5 : Représentation schématique des différents acteurs régulant la dynamique de l'actine au niveau du cône de croissance avec les voies de signalisation connues à ce jour (tous les effecteurs intracellulaires mentionnés dans le paragraphe II. 3. 1. ne sont pas représentés)

II. 3. 2. Le rôle des microtubules et des protéines qui leurs sont associées

Beaucoup de travaux de recherche se sont concentrés sur le cytosquelette d'actine comme cible principale pour la compréhension des comportements des cônes de croissance. Cependant, il a été montré que les microtubules étaient essentiels non seulement pour l'élongation axonale, mais aussi pour le guidage des cônes de croissance à proprement parler et en particulier pour l'orientation de ceux-ci en fonction des substrats rencontrés (Coles & Bradke, 2015; Kapitein & Hoogenraad, 2015). En effet, la caractéristique dynamique des microtubules capables de polymériser et de dépolymériser, en particulier dans le domaine P, est essentielle pour l'orientation de l'avancement du cône de croissance en réponse aux signaux de guidage extracellulaires. La présence d'un substrat adhésif entraîne une augmentation du nombre de microtubules exploratoires en direction du site d'adhésion entre la région P et le substrat. De plus, l'utilisation focale de drogue stabilisant les microtubules (Taxol) conduit à une réorientation du cône de croissance en direction de celle-ci, alors qu'à l'inverse un agent dépolymérisateur (Nocodazole), induit une répulsion du cône de croissance (Buck & Zheng, 2002). Les microtubules pourraient donc jouer le rôle de « capteurs de guidage » et contribuer à orienter l'avancée du cône de croissance en fonction du substrat rencontré par celui-ci.

Plusieurs protéines associées à ces microtubules interviennent dans les mécanismes conduisant à la motilité du cône de croissance (Figure 6). L'utilisation de mutants non fonctionnels de la

dynéine dans des neurones en culture diminue drastiquement le nombre de microtubules envahissant le domaine P et impacte la capacité des cônes de croissance à se diriger sur un substrat (K. A. Myers et al., 2006). Les kinésines 5 et 12 régulent le transport et la distribution des microtubules au niveau de l'axone et sont également impliquées dans les processus d'orientation (Kahn & Baas, 2017). Ces deux types de moteurs moléculaires contribueraient à la modulation des forces s'exerçant sur les microtubules qui sont nécessaires à la rotation des cônes de croissance (Kahn & Baas, 2017). La fidgétine et la spastine pourraient induire le clivage des microtubules longs en microtubules plus courts capable d'être réorientés et de polymériser à nouveau permettant de remodeler les réseaux de microtubules dans le domaine P au cours de l'étape de protrusion (Kahn & Baas, 2017). Les +TIPs protéines qui se lient aux extrémités plus des microtubules sont, elles aussi, mises en jeu dans les mécanismes de croissance et de motilité. APC, CLASP, EB1 et EB3 par exemple lient les microtubules et l'actine ce qui pourrait permettre, comme il a été mentionné plus haut, aux microtubules exploratoires d'être guidés au niveau des filopodes grâce à leurs interactions dynamiques avec les faisceaux d'actine-F (Figure 6) (Cammarata et al., 2017). Les protéines MAP1b, Tau et MAP6 qui sont associées aux microtubules et rassemblées sous la dénomination « MAP » (microtubule associated protein) ont été localisées au niveau du cône de croissance (Mack et al., 2000; Nozumi et al., 2009). CRMP4, qui appartient à la famille des CRMP mentionnées précédemment pour leur capacité à interagir avec l'actine mais largement assimilées à des MAP, a été impliquée dans la morphologie des microtubules au niveau du cône de croissance. En effet, CRMP4 est retrouvée non seulement au niveau du domaine P mais également dans la zone T au niveau de laquelle l'interaction entre les microtubules et l'actine est particulièrement importante pour les mécanismes de motilité du cône de croissance (M. Tan et al., 2015). L'absence de CRMP4 favorise la conformation des microtubules sous forme de faisceaux au détriment des boucles, plutôt caractéristiques des cônes de croissance en pause (Khazaei et al., 2014). L'inactivation localisée de CRMP2 au niveau du cône de croissance provoque une modification de l'orientation du cône de croissance, perturbant la croissance neuritique via probablement une modification de l'organisation des microtubules (Higurashi et al., 2012). Il a été mentionné plus haut l'existence d'un lien entre CRMP et la voie de certaines Rho GTPases pour la régulation du cytosquelette d'actine dans les cônes de croissance. Cependant, RhoA/ROCK jouent également un rôle dans la dynamique des microtubules au niveau du cône de croissance via CRMP2 et Cdc42 a récemment été décrit comme facilitant l'axonogenèse en renforçant la stabilité des microtubules à travers l'action de CRMP2 (A. Li et al., 2021; Rozés Salvador et al., 2016).

S'ils sont présents au niveau des cônes de croissance, les microtubules et les protéines qui leurs sont associées sont également très largement impliqués dans la structure et la morphologie des axones (Figure 6). MAP6 par exemple, a été retrouvée enrichie au niveau de l'axone durant la mise en place et le développement de celui-ci (Tortosa et al., 2017). De plus, l'absence de MAP6 dans des neurones en culture induit une augmentation de l'élongation axonale, soulignant l'importance de cette protéine dans la régulation du développement des axones (Boulan et al., 2020). Dans les neurones en développement, MAP1B est situé de manière préminente dans la partie distale de l'axone en extension et dans le cône de croissance où la proportion de microtubules dynamiques est très élevée (Black et al., 1994). Elle se lie principalement à ces microtubules dynamiques et favorise leur nucléation, leur polymérisation et leur stabilisation *in vitro* et *in vivo* (Takemura et al., 1992; Vandecandelaere et al., 1996). L'inhibition de l'expression de cette protéine dans des neurones corticaux en culture modifie la vitesse de croissance des microtubules à l'intérieur des axones, entraînant une inhibition de la croissance axonale (Tymanskyj et al., 2012). L'activité de MAP1B, promotrice de la croissance axonale en réponse à la nétrine1 une molécule de guidage, est dépendante de sa phosphorylation par les kinases Cdk5 (Cyclin-dependent kinase 5) et GSK3 β (Glycogen synthase kinase 3) (Del Río et al., 2004). Les CRMP (Collapsin Response Mediator Protein), participent aussi via divers mécanismes, à la régulation de la dynamique des microtubules nécessaire à la croissance des axones (Arimura & Kaibuchi, 2007). CRMP2 participe à l'élongation axonale à la fois en formant des hétérotrimères avec la tubuline et en favorisant son incorporation à l'extrémité plus des microtubules mais aussi en jouant le rôle de protéine stabilisatrice des microtubules polymérisés (Figure 6) (Fukata et al., 2002; Inagaki et al., 2001; Niwa et al., 2017). A l'inverse, CRMP5 en formant un complexe avec MAP2 et la tubuline bloque la polymérisation de cette dernière et abolie la promotion de la croissance induite par CRMP2 (Brot et al., 2010) (Brot et al. 2010). CRMP2 est également capable de réguler le transport de la tubuline soluble vers les parties distales des axones en croissance en se liant à la chaîne légère de la kinésine-1 (Kimura et al., 2005). De plus, CRMP2, via sa phosphorylation entre autres par Cdk5 et GSK3 β qui régule sa liaison aux microtubules, est un acteur de la signalisation répulsive de la sémaphorine 3A (Sema3A), induisant la collapse des cônes de croissance (Goshima et al., 1995; Uchida et al., 2005).

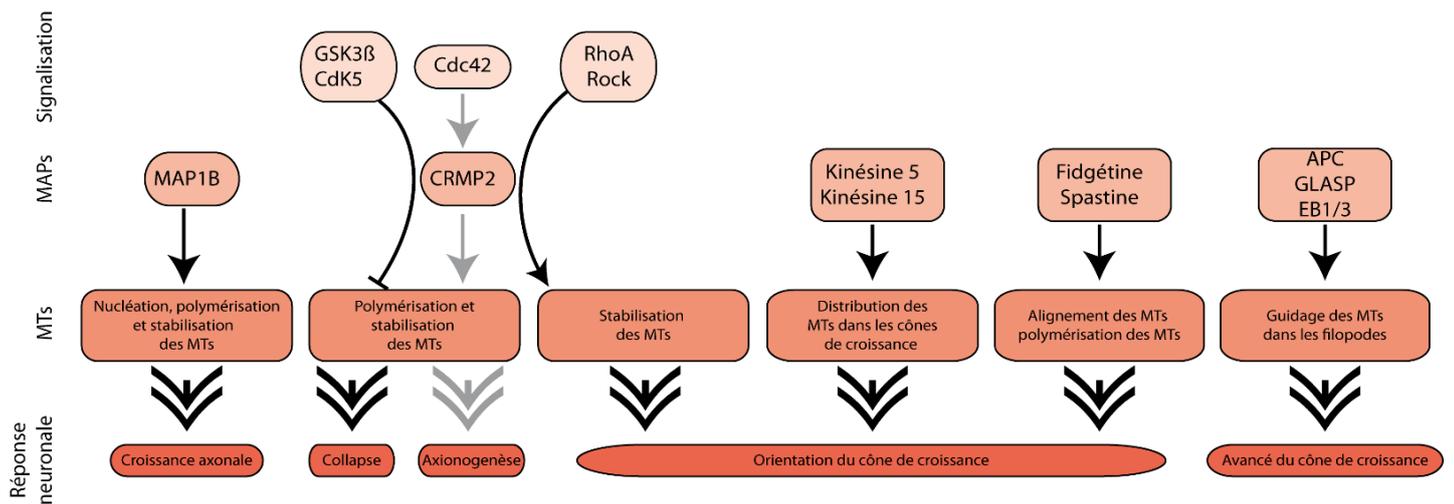


Figure 6 : Représentation schématique des différents acteurs régulant la dynamique des microtubules au niveau du cône de croissance et de l'axone avec les voies de signalisation connues à ce jour (tous les effecteurs intracellulaires mentionnés dans le paragraphe II. 3. 2. ne sont pas représentés).

II. 4. Les molécules de guidage et leurs récepteurs

Ces différents acteurs interagissant avec les microtubules et l'actine pour permettre leur organisation particulière au sein du cône de croissance sont contrôlés par différentes cascades de signalisation. Ces signalisations sont induites par la liaison de molécules de guidage, présentes dans l'espace extracellulaire, aux récepteurs exprimés à la surface du cône de croissance, conduisant à des phénomènes d'attraction ou de répulsion. Les molécules de guidage jouent un rôle crucial pour l'établissement de la connectivité neuronale car elles permettent d'orienter spécifiquement la croissance des neurones vers leurs cibles. Il existe plusieurs types de molécules pouvant être rencontrées par le cône de croissance et également plusieurs familles de récepteurs qui leur sont associées. Ces protéines sont présentes au niveau de la matrice extracellulaire ou exprimées par d'autres cellules le long de la trajectoire de l'axone qui navigue (Stoeckli, 2018). Nous passerons rapidement en revue les différentes familles de molécules de guidage avant de nous concentrer en particulier sur les séphorines.

II. 4. 1. Molécules d'adhérence cellulaires

Les molécules d'adhérence cellulaire, comme les intégrines ou les NCAM (Neural Cell Adhesion Molecule), interviennent à plusieurs niveaux dans la croissance axonale à travers la

modulation d'interactions entre le neurone et la matrice extracellulaire ainsi qu'entre le neurone et les cellules avoisinantes. Elles jouent un rôle crucial dans la motilité du cône de croissance en permettant d'initier la phase de protrusion via leur fonction de récepteurs pour les constituants de la matrice extracellulaire comme la laminine, la fibronectine ou le collagène. Elles vont induire l'ancrage du cône de croissance au substrat que celui-ci rencontre au cours de son avancée. Elles peuvent également être impliquées dans la reconnaissance des cellules entre elles, un élément crucial pour l'établissement de circuits fonctionnels. L'épissage alternatif du transcrit codant pour le DsCAM (Down syndrome Cell Adhesion Molecule) conduit à l'expression de plusieurs milliers d'isoformes de protéines membranaires. Chaque isoforme étant exprimée de manière spécifique par un neurone, celui est capable via des interactions homophiliques entre même isoforme DsCAM de reconnaître ses propres neurites et d'induire une réponse répulsive, évitant ainsi la fasciculation de ses neurites (D. Hattori et al., 2007; Wojtowicz et al., 2007). Les molécules d'adhérences peuvent également servir de corécepteurs pour d'autres types de molécules de guidage dont les rôles seront abordés dans la suite du manuscrit, comme les neurotrophines, les nétrines, les éphrines et les sémaphorines (Eva & Fawcett, 2014; J. P. Myers et al., 2011). Il a été montré qu'un défaut d'expression de la L1-CAM entraînait des erreurs de guidage des neurones corticospinaux dû à la capacité de L1-CAM à réguler la réponse répulsive des axones de ces neurones à la Sema3A en interagissant avec son récepteur la neuropiline 1 (Castellani et al., 2000, 2004). L'isoforme Nr-CAM, elle, s'associe à la neuropiline 2 et est un composant du complexe de récepteurs aux sémaphorines 3B et 3F (Falk et al., 2005). Les récepteurs DCC (Deleted in colorectal cancer) et UNC5 (Uncoordinated phenotype 5) aux nétrines, dont nous parlerons plus en détails dans la suite du manuscrit, font aussi partie de la famille des NCAM (Ye et al., 2019). Ces divers exemples montrent le lien étroit qui existe entre les molécules de guidage axonal et les molécules d'adhérence cellulaire.

II. 4. 2. Facteurs neurotrophiques et morphogènes

Les facteurs neurotrophiques ont un large éventail de fonctions biologiques dans plusieurs tissus, et notamment dans le système nerveux en favorisant la survie des neurones et la croissance des neurites. Parmi eux, certains jouent un rôle dans la médiation du guidage des axones, notamment le NGF (Nerve Growth Factor), le BDNF (Brain-Derived Neurotrophic Factor), le GDNF (Glial cell line-Derived Neurotrophic factor) et la NT-3 (neurotrophin-3). Ils se lient à divers récepteurs tyrosine kinase (TrkA, TrkB, et TrkC), ainsi qu'au récepteur p75

des neurotrophines. Malgré le fait que les facteurs neurotrophiques soient normalement considérés comme ayant un effet attractif sur les cônes de croissance, induisant une rotation du cône de croissance dans leur direction, ils peuvent également, dans des conditions particulières avoir des effets chimiorépulsifs sur le même cône de croissance (Ye et al., 2019). Les protéines Wnt (Wingless/Int-1), Shh (sonic hedgehog) et BMP (bone morphogenetic protein) sont des morphogènes dont le rôle dit « canonique » est de réguler la prolifération et la différenciation des cellules en agissant au niveau de la transcription des gènes. Cependant plus récemment il a été montré que ces protéines peuvent également diriger la rotation du cône de croissance, en utilisant des mécanismes de signalisation passant par des kinases telles que ROCK, PI3K ou encore GSK3 β (Yam & Charron, 2013).

II. 4. 3. Nétrines et draxine

Les nétrines, qui sont au nombre de trois chez les mammifères, présentent une forte homologie de séquence avec des membres de la famille de la laminine et sont une des familles de molécules de guidage les plus largement étudiées (Rajasekharan & Kennedy, 2009). La nétrine 1 est la mieux caractérisée au sein de cette classe de protéines et joue un rôle non seulement dans le guidage des axones, mais aussi dans leur ramification, la synaptogenèse, et la régénération des axones (Dent et al., 2004; Dun & Parkinson, 2017; Flores, 2011) Pour ce qui relève du guidage, la nétrine 1 possède la capacité d'agir sur l'attraction et la répulsion des cônes de croissance à la fois de manière diffusible mais également en jouant le rôle de molécule d'adhésion (Dominici et al., 2017; Varadarajan et al., 2017; Yamauchi et al., 2017). La nétrine 1 est capable de se lier à plusieurs récepteurs permettant d'induire des réponses cellulaires diverses. DCC est un récepteur transmembranaire de la superfamille des immunoglobulines qui est fortement exprimé dans les neurones projetant au niveau de la colonne vertébrale, de la rétine, mais aussi du cortex, de l'hypothalamus et du bulbe olfactif (Gad et al., 2000; Johansson et al., 2001; Keino-Masu et al., 1996; Shu et al., 1999). Ce récepteur est impliqué à la fois dans l'attraction et dans la répulsion des cônes de croissance induites par la nétrine 1 (Hamelin et al., 1993 ; Chan et al., 1996 ; Keino-Masu et al., 1996 ; Kolodziej et al., 1996 ; Fazeli et al., 1997 ; Colavita et Culotti, 1998 ; Finci et al., 2014). Il existe également le récepteur néogénine qui présente une structure relativement similaire à celle du DCC et partage avec lui des effecteurs intracellulaires de signalisation communs (Phan et al. 2011, Li et al. 2008). La famille des récepteurs aux nétrines UNC5 comprend elle quatre isoformes chez les vertébrés (UNC5A, UNC5B, UNC5C, UNC5D). Ils médient le guidage axonal répulsif de la nétrine 1 par le biais d'une

hétérodimérisation avec le DCC pour la répulsion à longue distance, et potentiellement d'une hétérodimérisation avec le DsCAM, un autre récepteur de la nétrine 1, pour la répulsion à courte distance (Colavita & Culotti, 1998; Finci et al., 2014; Keleman & Dickson, 2001; Purohit et al., 2012). Les différentes signalisations engendrées par les nétrines et leurs récepteurs font intervenir, entre autres, la kinase FAK (Focal Adhesion Kinase) impliquée dans la migration cellulaire et les membres de la famille des Rho GTPases qui eux même recrutent la kinase ROCK ainsi que N-WASP (N-Wiskott-Aldrich Syndrome family Protein), un facteur de nucléation de l'actine et le complexe Arp2/3 (Boyer & Gupton, 2018). MAP1b qui est un régulateur de la dynamique des microtubules, et également des Rho GTPases, a été identifié comme un acteur de la voie attractive de la nétrine 1 (Del Río et al., 2004). Récemment il a été montré que le récepteur DCC pouvait interagir directement avec la tubuline en présence de la nétrine 1 (Huang et al., 2018).

Il y a quelques années une nouvelle molécule de guidage, la draxine, a été découverte. Elle se lie elle aussi aux récepteurs néogénine et UNC 5 mais ne possède pour autant pas d'homologie de séquence avec les nétrines. Elle exerce un rôle répulsif sur les neurones et est impliquée dans la formation de la moelle épinière, des commissures au niveau du cerveau antérieur, ainsi que dans l'établissement de la formation hippocampale (Islam et al., 2009).

II. 4. 4. Ephrines

La famille des éphrines, une autre catégorie de molécules de guidage, est divisée en deux types : les éphrines A (5 membres) et les éphrines B (3 membres). Elles ne sont pas sécrétées mais exprimées à la surface des cellules via soit une ancre GPI (glycosylphosphatidylinositol) pour les éphrines A, soit via leur domaine transmembranaire pour les éphrines B (Ye et al., 2019). Ces deux familles interagissent respectivement avec les récepteurs EphA (8 récepteurs) et EphB (5 récepteurs), des récepteurs à tyrosine kinase qui sont impliqués dans le développement des commissures au niveau du cerveau postérieur, dans l'établissement des projections thalamiques et spinales ainsi que dans la mise en place du système visuel (Feldeim & O'Leary, 2010; Kadison et al., 2006; Y. Zhu et al., 2006). En l'absence d'éphrine, le récepteur Eph A est lié à l'éphexine 1 qui active RhoA, Rac1 et Cdc42 et favorise la croissance de l'axone. La stimulation d'EphA par l'éphrine A induit la phosphorylation de l'éphexine qui va interagir préférentiellement avec RhoA augmentant ainsi son activité et favorisant l'effondrement du cône de croissance (Sahin et al., 2005). Les éphrines médient donc à la fois des réponses

d'attraction et de répulsion du cône de croissance mais entrent en jeu également dans la ramification de axones et dans l'établissement de connexions synaptiques (Joly et al., 2014; Shen & Cowan, 2010). Cette catégorie de molécules de guidage peut également induire des signalisations reverse ou inversée (« reverse signalling ») dans lesquelles elles transduisent le signal induit par leur liaison à leurs récepteurs (Bush & Soriano, 2009; Joly et al., 2014).

II. 4. 5. Slits

Les protéines Slits sont généralement sécrétées, mais peuvent aussi être associées aux membranes cellulaires et à la matrice extracellulaire. Trois gènes de Slit (Slit1 à 3) existent chez la plupart des vertébrés et 4 gènes codent pour leurs récepteurs Robo dont la structure est très similaire à celle des DCC. La signalisation Slit/Robo joue un rôle crucial dans la croissance des axones de la moelle épinière, ainsi que dans le branchement axonal et l'orientation de ces prolongements chez les neurones sensitifs (Blockus & Chédotal, 2016; Ma & Tessier-Lavigne, 2007). Il a été montré que la liaison des Slits sur leur récepteurs entraîne le recrutement de protéines srGAP (Slit-Robo-GTPases) qui vont à leur tour activer les Rho GTPases et en particulier Rac1 (Blockus & Chédotal, 2016). Des protéines de la famille des Ena/VASP sont également recrutées au niveau des récepteurs Robo1 et 2 lors de la fixation de Slit (Blockus & Chédotal, 2016). Cette signalisation Slit/Robo peut interagir avec celle, attractive, de la nétrine et de son récepteur DCC et en moduler les effets, créant ainsi une balance répulsion/attraction essentielle pour le développement de certaines projections sur de longues distances (Kim et al., 2014). Slit peut également être clivé et son fragment C-terminal se lier spécifiquement à la plexine A1, un récepteur des sémaphorines, indépendamment des récepteurs Robo (Delloye-Bourgeois et al., 2015).

II. 4. 6. Sémaphorines

En 1993, une protéine, désignée à l'époque sous le terme de collapsine, est décrite dans le système nerveux d'embryon de poulet comme étant capable d'inhiber la motilité des cônes de croissance en induisant leur collapse (Luo et al., 1993). Depuis cette découverte, cette protéine a été renommée sémaphorine 3A (Sema3A) et plus d'une vingtaine d'autres sémaphorines ont été caractérisées chez différentes espèces. Elles constituent l'une des familles de molécules de guidage les plus importantes et les mieux conservées phylogénétiquement. La famille des

sémaphorines peut être divisée en huit classes. Les classes 1, 2 et 5 sont retrouvées chez les invertébrés et les classes 3 à 7 appartiennent aux vertébrés. Les classes 2 et 3, ainsi que la sémaphorine virale 8, sont sécrétées, tandis que les classes 4 à 6 sont des protéines transmembranaires (Limoni, 2021; Yazdani & Terman, 2006). La classe 7 est la seule protéine à ancrage GPI. Chaque sémaphorine est constituée d'un grand domaine sema, d'un domaine Plexine-Sémaphorine-Intégrine (PSI), de domaines de type immunoglobuline (Ig) et de répétitions de la thrombospondine (Figure 8) (Goodman et al., 1999).

Les deux familles majeures de récepteurs pour ces molécules de guidage sont les neuropilines (Nrp1 et Nrp2) et les plexines (PlxA1 à 4, PlxB1 à 3, PlxC1 et D1) (Figure 8). Les sémaphorines sont désormais reconnues comme étant des régulateurs cruciaux, dans différents organes, de très nombreux processus biologiques comme la mise en place des systèmes vasculaire et immun, le développement des muscles squelettiques et bien sur la mise en place du système nerveux (Hu & Zhu, 2018; Limoni, 2021; Yazdani & Terman, 2006). Les sémaphorines de classe 3 (Sema3A à G) dont fait partie la sémaphorine 3E (Sema3E) qui fait l'objet de notre étude, ont été retrouvées dans des tissus non neuronaux dans lesquels elles régulent par exemple la morphogénèse cardiaque, l'angiogénèse mais sont également responsables du développement de cancers via leurs effets sur la croissance, la survie, la migration et la prolifération des cellules. Cependant nous nous concentrons majoritairement pour la suite du manuscrit sur leur rôle dans le système nerveux et plus particulièrement dans l'établissement des connexions neuronales. La plupart des sémaphorines de classe 3 se lient aux neuropilines, elles-mêmes associées à un membre de la famille des plexines qui vont permettre la transduction des signaux à travers la membrane plasmique neuronale (Tamagnone et al., 1999). Une exception est faite cependant pour la Sema3E qui interagit directement avec la PlxD1 (Gu et al., 2005).

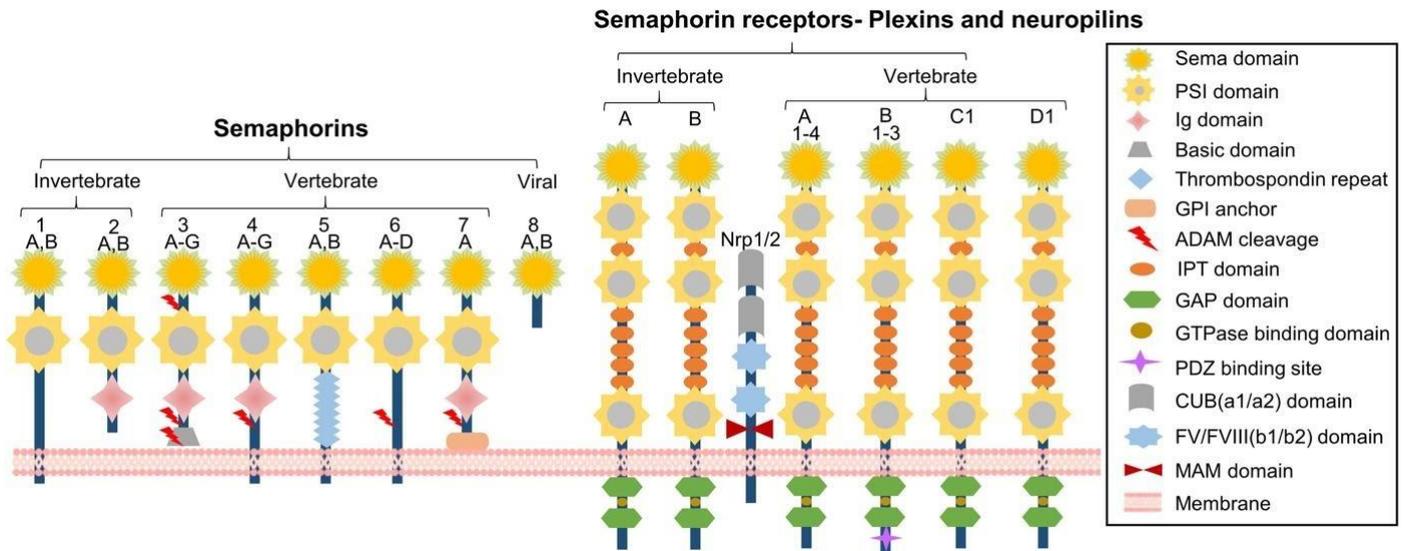


Figure 7 : Représentation schématique des différentes sémaphorines et de leurs récepteurs
S. Hu and L. Zhu, 2018

III. sémaphorine 3A et sémaphorine 3E

II. 1. La sémaphorine 3A, première voie de signalisation dans laquelle une CRMP a été caractérisée

La Sema3A est la sémaphorine la plus étudiée et la mieux caractérisée aujourd'hui. Elle a notamment été décrite comme intervenant à différents stades du développement neuronal en jouant un rôle dans la migration et la polarité neuronale ainsi que dans la synaptogénèse mais est également impliquée dans des processus de régénération et de plasticité chez l'adulte (Gavazzi, 2001; Y. Yoshida, 2012). Dans les mécanismes de croissance neuritique, elle est capable d'avoir un effet soit répulsif soit attractif sur ces prolongements et régule ainsi le guidage axonal et la croissance dendritique. Les mécanismes conduisant à la répulsion sont pour l'heure mieux connus. La liaison de la Sema3A sur la Nrp1 va dissocier de la PlxA, la protéine FARP qui va ensuite activer Rac, une protéine de la famille des Rho-GTPases. Les plexines possèdent dans leurs domaines intracellulaires deux régions hautement conservées qui partagent des similarités de séquence avec des GTPases. Ce domaine GTPases des plexines va leur permettre, en association avec Rac, de recruter une autre protéine, de la famille des Rho GTPases, appelée Rnd1. Rnd1 et le domaine intra-cytoplasmique de la PlxA vont ensuite inhiber la voie R-Ras/PI3K ce qui conduit à l'inactivation de l'intégrine et à la dé-adhésion du

cône de croissance (Toyofuku et al., 2005). En parallèle la liaison de la Sema3A sur son récepteur conduit à la régulation négative de PTEN, une phosphatase de PIP3 et donc à l'inactivation de la voie PI3K/Akt (Figure 8) (Chadborn et al., 2006). Cette signalisation aboutit au passage de GSK3 β d'une forme phosphorylée sur le résidu sérine 9 inactive à un état non phosphorylé actif ce qui va lui permettre à son tour de phosphoryler CRMP2 (M. Brown et al., 2004; Eickholt et al., 2002; Uchida et al., 2005). CRMP2 phosphorylé n'interagit plus avec les microtubules ce qui va perturber leur stabilité et induire la collapse des cônes de croissance (Fukata et al. 2002). C'est dans cette voie de signalisation Sema3A que les CRMP, et en particulier CRMP2, ont été caractérisées pour la première fois (Goshima et al., 1995)(Goshima et al. 1995). Son rôle y est crucial puisqu'il a été montré que l'utilisation de mutant CRMP2 non phosphorylable par la GSK β rendait les neurones insensibles à l'effet de la Sema3A (Uchida et al., 2005). Les CRMP ont aussi été retrouvées dans un autre mécanisme de collapse induit par la Sema3A. En effet les CRMP sont des substrats des tyrosines kinase Fes/Fsp et Fer, connues pour réguler aussi la phosphorylation des microtubules. Ces deux kinases sont également impliquées dans la collapse des neurones dans les DRG (Dorsal Root Ganglions) induit par la Sema3A (Mitsui et al., 2002; Shapovalova et al., 2007). Bien qu'il manque à l'heure actuelle des éléments pour comprendre avec précision à quel niveau de la signalisation Sema3A ces kinases interviennent, il semblerait que la liaison de la Sema3A sur la Nrp1 induise la phosphorylation de la PlxA1 ainsi que de CRMP2 par ces kinases, bloquant son interaction avec les microtubules (Mitsui et al., 2002). L'implication des différentes isoformes CRMP dans des processus de croissance et de guidage sera développée plus en détails dans la partie consacrée aux CRMP.

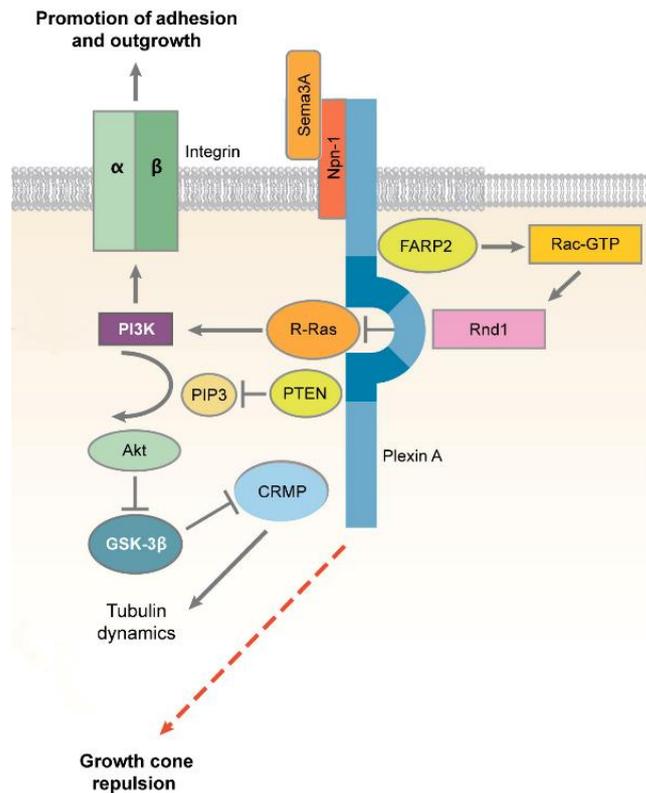


Figure 8 : Représentation schématique de la signalisation induite par la Sema3A conduisant à la répulsion du cône de croissance et à l'inhibition de l'élongation axonale d'après Tran et al., 2007

II. 2. La sémaphorine 3E

II. 2. 1. Rôle de la sémaphorine 3E dans la connectivité neuronale

Comme les autres sémaphorines de classe 3, la Sema3E contient un domaine Sema, un PSI (Plexine-Sémaphorine-Intégrine), un domaine Ig (immunoglobuline) et une queue basique au niveau de l'extrémité C-terminale (Eichmann et al., 2005) (Figure 7). Son récepteur, la PlxD1 contient un domaine Sema, trois séquences MRS (Met Related Sequences) partageant une forte homologie avec le récepteur Met, trois motifs riches en glycine/proline, un seul domaine transmembranaire et deux domaines intracellulaires hautement conservés connus ensemble sous le nom de domaine SEX-plexine. Si ces caractéristiques sont retrouvées communément chez toutes les plexines, la PlxD1 diffère des autres membres par son troisième motif MRS, qui ne contient que six des huit cystéines conservées normalement rencontrées dans un MRS. La Sema3E et la PlxD1 interagissent via leur domaine Sema respectifs et ont été décrites dans

différents processus biologiques mis en place au cours du développement (Oh & Gu, 2013; Tamagnone et al., 1999). Elles ont été étudiées pour la première fois dans le contexte vasculaire de la formation des vaisseaux intersomatiques, où la Sema3E est exprimée dans la région caudale de chaque somite en développement, tandis que la PlxD1 est exprimée dans les vaisseaux sanguins intersomitiques. La Sema3E limite la croissance et la ramification des vaisseaux dans l'espace intersomitique (Gu et al., 2005). Au niveau du système nerveux, la Sema3E est retrouvée dans les neurones moteurs et la PlxD1 dans les neurones sensitifs proprioceptifs qui établissent entre eux des connexions monosynaptiques et font partie des circuits spinaux reflexes. In vivo, l'absence de l'une ou l'autre de ces deux protéines altère la mise en place de ces synapses particulières et induit la formation de connexions aberrantes (Pecho-Vrieseling et al., 2009). La Sema3E est également sécrétée par les neurones thalamo-striataux et la PlxD1 est retrouvée spécifiquement dans un sous-type de leurs neurones postsynaptiques, les medium spiny neurons (MSN) de la voie directe. La voie directe (striato-nigrale) et la voie indirecte (striato-pallidale) sont deux efférences distinctes des ganglions de la base mais leurs fonctionnements sont intimement liés. La régulation négative de la Sema3E ou de la PlxD1 favorise la synaptogénèse au niveau des neurones MSN de la voie directe mais sans affecter les synapses de la voie indirecte (Ding et al., 2012). Ces deux études mettent en évidence l'implication du complexe Sema3E/PlxD1 dans l'établissement correct de circuits neuronaux par la régulation très spécifique de la formation de certaines synapses.

L'expression de Sema3E a aussi été détectée dans cellules pyramidales de la CA1 et CA3 de l'hippocampe qui sont adjacentes au subiculum (Figure 10). Les axones efférents des régions CA3 et CA1 agissent comme sources de Sema3E afin de guider la croissance axonale des neurones du subiculum (Chauvet et al., 2007, 2013). En effet, les efférences de la CA3/CA1 projettent le long de la même voie initiale que les axones subiculo-mammillaires (Figure 9). A la différence des neurones corticaux ou striataux, les neurones du subiculum expriment la Nrp1 et le VEGFR2, deux corécepteurs de la PlxD1 (Bellon et al., 2010; Chauvet et al., 2007, 2013). L'absence de Sema3E dans la CA1/CA3 se traduit par un retard important de la croissance des axones subiculo-mammillaires formant principalement le fornix post-commissural. (Figure 9B).

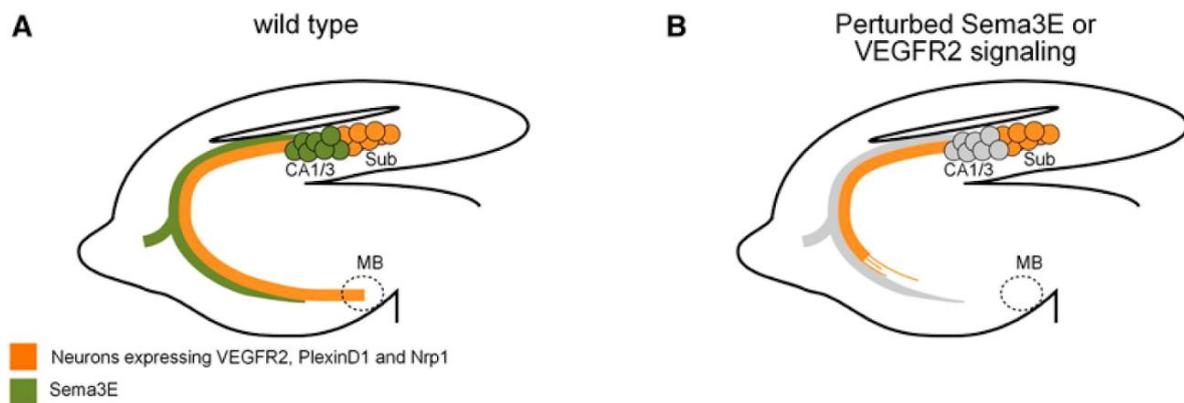


Figure 9 : Représentation schématique des projections subiculo-mammillaires (A) et de l'hypoplasie de ces projections induite par l'absence d'expression de la Sema3E ou du VEGFR2 (B) d'après Chauvet et al. 2013

II. 2. 2. La sémaphorine 3E, une molécule de guidage bi-fonctionnelle

En ce qui concerne son rôle dans la croissance neuritique, la sema3E est capable d'avoir des rôles antagonistes suivant la région du cerveau où elle est exprimée et suivant la population de neurones sur laquelle elle se lie. Les neurones corticofugaux et striatonigraux qui expriment seulement la PlxD1 sur laquelle va venir se lier la Sema3E réagissent par un mécanisme de répulsion en présence de cette molécule de guidage (Chauvet et al., 2007). Ce mécanisme répulsif induit par la Sema3E est assez similaire à ce qui a été décrit précédemment pour la Sema3A. La PlxD1 va recruter, via son domaine GTPase, Rnd2 qui va inhiber R-Ras ce qui induirait l'inhibition de la voie PI3K/Akt et l'activation de la GSK3 β (Y. Ito et al., 2006; Silver et al., 2014; Uesugi et al., 2009). En revanche, les neurones du subiculum qui projettent au niveau des corps mamillaires et constituent le fornix post-commissural, expriment à la fois PlxD1 et la Nrp1. Sur cette population neuronale, la Sema3E exerce un effet attractif et stimule la croissance axonale par un mécanisme inconnu à ce jour permettant de passer de la répulsion à l'attraction grâce à la présence de Nrp1. A l'heure actuelle il a été montré que la Nrp1 et la PlxD1 interagissent indépendamment de la présence de la Sema3E et que les effets antagonistes que peut avoir la Sema3E étaient bien dus à la présence ou non de la Nrp1 (et en particulier à son domaine extracellulaire) (Chauvet et al., 2007). Le VEGFR2, exprimé lui aussi par les neurones du subiculum joue le rôle de corécepteur dans le mécanisme d'attraction en permettant

la transduction du signal. A l'inverse le VEGFR2 n'intervient pas dans l'effet répulsif de la Sema3E (Bellon et al., 2010). Dans un contexte attractif, la liaison de la Sema3E sur la PlxD1 induit l'autophosphorylation du VEGFR2, conduisant à la phosphorylation de PI3K, puis d'Akt et enfin de GSK3 β . Pour ces deux mécanismes antagonistes induits par la Sema3E sur différentes populations de neurones, les effecteurs régulant, in fine, le cytosquelette et permettant la croissance ou la rétraction des axones sont à ce jour inconnus.

II. 3. Le fornix, un exemple de l'implication de la Sema3E dans l'établissement des connectivités neuronales

La Sema3E participe, de par son effet attractif sur les axones des neurones du subiculum, au développement d'un tract neuronal, le fornix (Bellon et al., 2010; Chauvet et al., 2007).

II. 3. 1. Le subiculum, une structure appartenant à la formation hippocampique

La formation hippocampique, qui est généralement définie comme la région comprenant le gyrus denté, l'hippocampe à proprement parler (constitué des aires CA1 à CA3) et le subiculum, est cruciale pour la mémoire épisodique et spatiale (Van Strien et al., 2009). Le subiculum est composé de trois couches de cellules différentes, une couche moléculaire, une couche de cellules pyramidales et une couche polymorphique (O'Mara et al., 2001). Une étude récente utilisant des techniques d'hybridation in situ a mis en évidence quatre gènes dont l'expression localisée à des domaines précis permet de subdiviser la couche pyramidale en quatre autres couches. De façon similaire à ce qui a été fait pour le cortex cérébral, les auteurs définissent 5 régions subiculaires sur la base de la distribution et de la combinaison de l'expression de ces gènes au sein des couches : le subiculum dorsal, lui-même constitué d'une partie dorsale et d'une partie ventrale, le prosubiculum et le subiculum ventral à l'intérieur duquel, ils identifient également une région plus ventrale (Bienkowski et al., 2018). Le subiculum reçoit des projections venant majoritairement de l'aire CA1 et du cortex entorhinal mais est également innervé par certaines régions thalamiques et par l'amygdale (Cembrowski et al., 2018; Jankowski et al., 2014; Mathiasen et al., 2017; Witter, 2006). Pour ce qui est des efférences, le subiculum émet des projections en direction de la CA1 mais aussi vers diverses zones corticales (dont le cortex entorhinal) et sous-corticales comme des noyaux thalamiques ou

hypothalamiques (Aggleton & Christiansen, 2015; Kinnavane et al., 2018; Witter, 2006). La projection à laquelle nous nous sommes intéressés au cours de ces travaux de thèse est celle qui est connue sous le nom de fornix post-commissural et qui vient se connecter au niveau des corps mamillaires, une région de l'hypothalamus (Bubb et al., 2017; Christiansen et al., 2016; Dillingham et al., 2015; Wright et al., 2010). Pour l'heure, les neurones au sein de subiculum, dont les projections axonales constituent cette pré-commissure n'ont pas été identifiés avec précision. Cependant, les récents travaux de Bienkowski et de son équipe ont pu montrer que des neurones de la couche polymorphique, présents entre autres dans le subiculum dorsal, expriment la PlxD1, un récepteur retrouvé au niveau des axones du fornix pré-commissural (Bienkowski et al., 2018).

II. 3. 2. Le fornix

II. 3. 2. 1. Neuroanatomie

Le fornix peut être découpé en plusieurs régions (Figure 11) (Senova et al., 2020). Il est constitué de la fimbria, qui est encore attachée à l'hippocampe, puis devient un faisceau détaché, formant la crura fornicaire. Les deux crura (une de chaque hémisphère) se rejoignent sous le corps calleux pour former le corps du fornix (Catani et al., 2002; Douet & Chang, 2015). Ces fibres suivent une trajectoire postéro-antérieure dans le cerveau pour se diviser à nouveau autour de la commissure antérieure et devenir les colonnes du fornix (une par hémisphère). Chaque colonne se sépare ensuite en fibres pré-commissurales, qui innervent le septum, la bande diagonale de Broca et le noyau accumbens, et en fibres post-commissurales. Les fibres post-commissurales se divisent en deux faisceaux plus petits, l'un innervant les corps mamillaires de l'hypothalamus (fornix post-commissural) et l'autre transportant des fibres vers les noyaux hypothalamiques antérieurs (mcht) (Matsumoto et al., 2019).

Rodent Fornix

Human Fornix

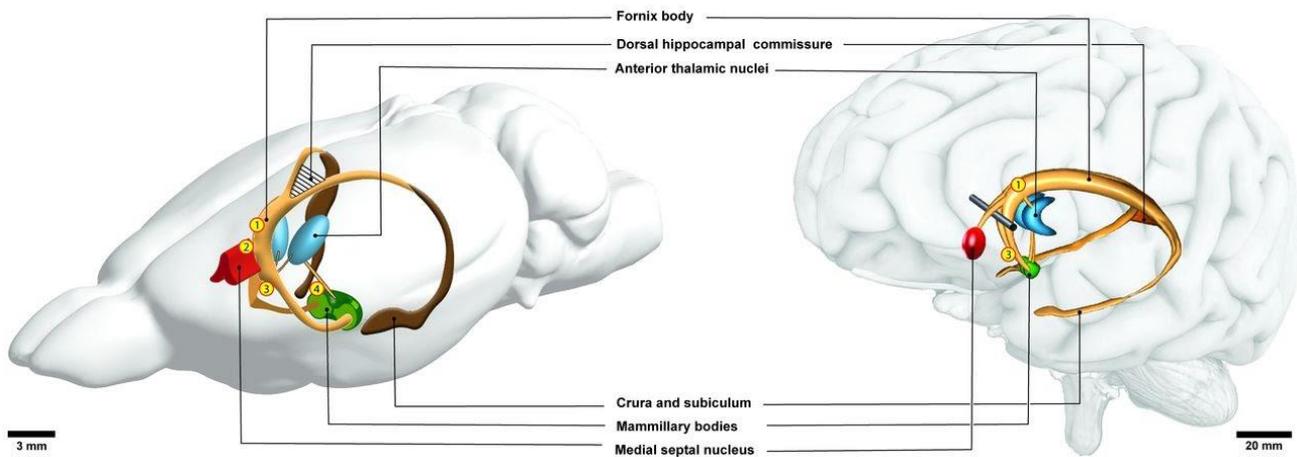


Figure 10 : Représentation schématique de l'anatomie du fornix chez le rongeur (à gauche) et chez l'homme (à droite) d'après Senova et al. 2020

II. 3 .2. 2. Les effecteurs contrôlant le développement du fornix post-commissural

Le développement du fornix post-commissural commence aux alentours de E15, au moment où les axones des neurones du subiculum débutent leur croissance et se termine, chez la souris, après la naissance quand ceux-ci ont atteint les corps mamillaires. Plusieurs molécules de guidage sont probablement impliquées dans le développement du fornix post-commissural, la Sema3E étant celle dont la signalisation a été la mieux caractérisée.

L'invalidation de la draxine et de la sémaphorine 6A induit des défauts de fornix post-commissural

Les souris invalidées pour le gène codant pour la draxine, une molécule de guidage ayant des propriétés répulsives, présentent une absence totale de développement de cette structure (S. Zhang et al., 2010). Cependant une augmentation de l'apoptose au niveau du subiculum de ces souris au stade E18.5 a été notée, suggérant que l'absence de fornix post-commissural puissent venir de la mort des neurones dont les axones constituent ce tract plutôt que d'un problème de croissance axonale. La délétion de la sémaphorine 6A conduit elle à une forte défasciculation

du fornix post-commissural (Rünker et al., 2011). Ces deux études suggèrent que ces deux molécules de guidage pourraient être impliquées dans le développement de cette structure. Cependant aucune étude à ce jour n'a investigué leur rôle direct sur la croissance axonale des neurones du subiculum et/ou l'implication de leur récepteur respectif dans l'établissement de ce tract neuronal.

La Sema3E une molécule de guidage essentielle au développement du fornix post-commissural

L'utilisation de DiI, un traceur lipidique, dans le cerveau de souris à E17.5 invalidées pour le gène codant pour la Sema3E (Sema3E KO) a montré que très peu de prolongements axonaux étaient présents au niveau du fornix post-commissural par rapport aux souris WT. Par ailleurs, le fornix pré-commissural (ou crura) présentait, lui, un développement normal, tendant à montrer que la Sema3E est spécifiquement impliquée dans la croissance du fornix post-commissural. Des défauts similaires ont été retrouvés chez des souris KO pour la PlxD1 (PlxD1 KO), le récepteur de la Sema3E. Les neurones du fornix post-commissural, expriment en plus de la PlxD1, la Nrp1 et le VEGFR2 ce qui permet à la Sema3E d'avoir un effet attractif sur cette population de neurones. La délétion du VEGFR2 induit un phénotype similaire à ce qui a été observé chez les Sema3E KO ou PlxD1 KO et ce retard se manifeste dans ces différents mutants à l'âge adulte par une diminution du diamètre du fornix post-commissural (Bellon et al., 2010; Chauvet et al., 2007).

MAP6, un effecteur intracellulaire nécessaire à la croissance du fornix post-commissural médiée par la Sema3E

Par la suite, notre équipe a constaté dans un autre modèle de souris KO, pour la protéine MAP6 (Microtubules Associated Protein 6) cette fois-ci, une absence drastique de développement du fornix post-commissural, qui n'était pas corrigé arrivé à l'âge adulte (Figure 11) (Deloulme et al., 2015). MAP6 a été initialement découverte pour ses fonctions régulatrices des microtubules, mais il est apparu par la suite qu'elle était impliquée dans bien d'autres mécanismes (Cuveillier et al., 2021). Pour ce qui est du fornix post-commissural, il a été montré, en culture, que les neurones de subiculum issus de souris MAP6 KO ne voyaient plus leur croissance axonale stimulée en présence de Sema3E (Figure 12). MAP6 est donc un effecteur intracellulaire de la

voie de signalisation de la Sema3E. Une hypothèse probable quant à son rôle spécifique dans ce mécanisme aurait été de penser que MAP6 serait située en aval de la cascade de signalisation et régulerait la dynamique des microtubules, un mécanisme nécessaire à la croissance axonale. Mais, l'utilisation de mutant MAP6 privé des domaines de liaison aux microtubules dans des neurones de subiculum MAP6 KO et pour autant capable de restaurer la stimulation de la croissance de ces neurones par la Sema3E, a permis de réfuter cette hypothèse. De plus, des expériences d'immunoprécipitation ont mis en évidence l'interaction de MAP6 avec la PlxD1, la Nrp1 et le VEGFR2, ce qui situerait MAP6 dans cette signalisation plutôt au niveau des récepteurs de la Sema3E (Figure 13) (Deloulme et al., 2015). Cependant, le phénotype observé chez les souris MAP6 KO est plus drastique que celui des souris Sema3E, avec une absence complète de fornix post-commissural, ce qui laisse supposer que le rôle de MAP6 dans le développement de ce tract n'est pas limité à la signalisation Sema3E.

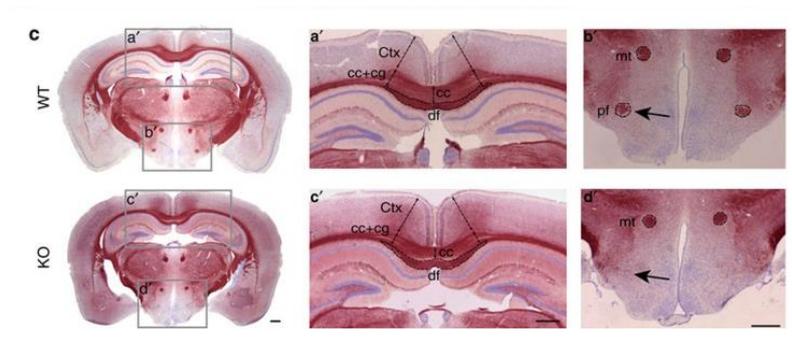


Figure 11 : Coupes coronales de cerveaux de souris sauvages (WT) et MAP6 KO adultes marquées au chlorure d'or mettant en évidence l'absence de développement du fornix post-commissural (pf) chez les MAP6 KO d'après Deloulme et al., 2015

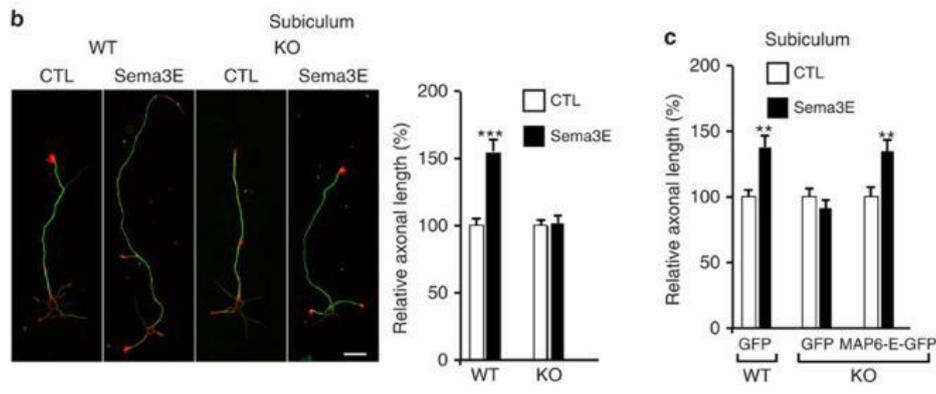


Figure 12 : Images de neurones de subiculum de souris sauvages (WT) ou MAP6 KO en culture en absence (ctl) ou en présence de Sema3E (b)
 Histogrammes représentant la longueur axonale relative observées chez des neurones de subiculum de souris sauvages (WT) ou MAP6 KO en culture transfectées ou non avec un plasmide codant pour de la MAP6 exogène (c)
 d'après Deloulme et al., 2015

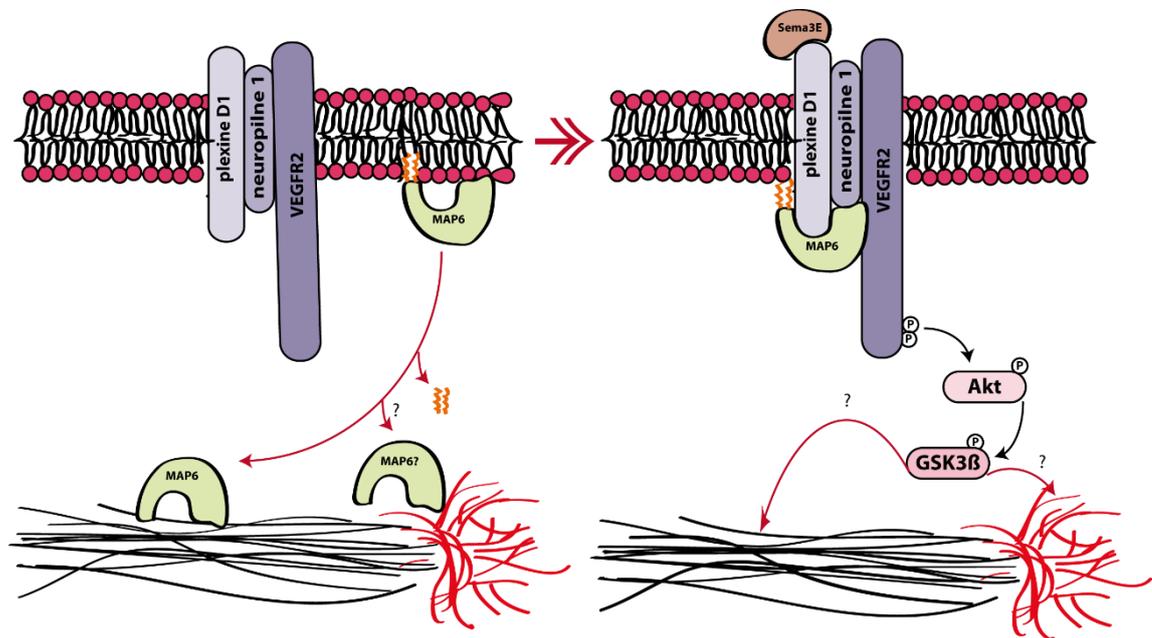


Figure 13: Représentation schématique de la signalisation Sema3E et du rôle joué par MAP6. La liaison de la Sema3E sur la PlxD1 induit l'autosphosphorylation du VEGFR2 et le recrutement de la voie PI3K/Akt conduisant à l'inhibition de GSK3β via sa phosphorylation et à la stimulation de la croissance axonale. Le ou les acteur(s) assurant le remodelage des microtubules et de l'actine, nécessaire à la croissance axonale, restaient à identifier.
 d'après Chauvet et al., 2007 ; Bellon et al., 2010 ; Deloulme et al., 2015

II. 3 .2 .3. Fonction du fornix et ses altérations dans les pathologies du cerveau

Rôle du fornix

Le fornix dans son ensemble fait partie du système limbique qui a été décrit par James W. Papez comme étant le circuit de l'expérience et du comportement émotionnel. Différentes structures corticales (gyrus cingulaire, gyrus parahippocampique, cortex entorhinal) et sous-corticales (amygdale, septum, noyau accumbens, hypothalamus, hippocampe et fornix) le composent (Papez, 1937). Plus tard, ses fonctions ont été liées au plaisir et à la récompense, ainsi qu'à la mémoire et à l'intégration des souvenirs (Douet & Chang, 2015; RajMohan & Mohandas, 2007). Des déficits de mémoire similaires ont été observés suite à des lésions dans différentes structures le composant, suggérant que l'intégrité du circuit de Papez est aussi importante que celle des régions individuelles qui le constituent (Thomas et al., 2011). Malgré cela, des fonctions plus précises ont pu être attribuées au fornix en particulier et il est aujourd'hui associé dans la littérature de manière quasi-systématique à la mémoire épisodique (Benear et al., 2020). La mémoire épisodique appartient au mécanisme de la mémoire à long terme et fait référence au souvenir conscient d'événements inscrits dans des contextes de temps et de lieu spécifiques. La mémoire épisodique décline fréquemment avec le vieillissement et devient souvent déficiente dans les maladies neurodégénératives et les troubles psychiatriques (Samson & Barnes, 2013). La plupart des études réalisées sur le fornix dans des modèles animaux (rongeurs et primates non-humains) consistent à effectuer une lésion au niveau de cette structure et à tester ensuite la capacité de l'animal à apprendre une nouvelle tâche. Les expériences de mémorisation utilisées chez ce type de sujet peuvent être de simples tâches de reconnaissance visuelle mais sont généralement de nature spatiale ou de navigation. Ce genre de tâche requiert la perception et le stockage d'informations liées au contexte spatio-temporel et constituent un moyen efficace de tester la mémoire épisodique (Benear et al., 2020). Ces expériences ont permis de montrer qu'une section de la fimbria fornix entraîne systématiquement des déficits importants dans l'apprentissage de nouveaux itinéraires et de nouveaux emplacements spatiaux. (De Bruin et al., 2001; Whishaw & Tomie, 1997). En revanche, les lésions de ce tract n'altèrent pas la capacité à effectuer des tâches de mémoire non-spatiale telles que la reconnaissance d'objets chez les animaux (Bussey et al., 2000; Wilson et al., 2007). Chez l'homme il existe peu d'études concernant les lésions du fornix, les dommages exclusivement localisés dans cette

région étant rares. Les résultats basés sur une littérature clinique relativement restreinte rapportent le fait que des lésions au niveau de cette structure donnent lieu à une amnésie antérograde persistante, touchant principalement à la mémoire verbale (liée au langage) et la mémoire visuelle (Korematsu et al., 2010).

Implication dans des pathologies neurodégénératives et psychiatriques

Le rôle du fornix chez l'homme a été particulièrement étudié dans le cadre de maladies neurodégénératives et psychiatriques (Benear et al., 2020; Douet & Chang, 2015). En effet des recherches ont montré que le fornix de patients atteints d'Alzheimer était atrophié par rapport à des sujets sains et que cette atrophie était corrélée avec une diminution des performances cognitives relatives à la mémoire à court et à long terme (T. Hattori et al., 2012; Ringman et al., 2007; Sánchez et al., 2020). Fletcher et al. suggèrent que les réductions du volume du fornix observées chez certaines personnes âgées pourraient s'expliquer, au moins en partie, par une dégénérescence cliniquement silencieuse de l'hippocampe. La dégénérescence du fornix pourrait être un facteur prédictif du déclin cognitif retrouvé dans la maladie d'Alzheimer (Fletcher et al., 2013). Le traitement de patients via des méthodes de stimulation profonde au niveau du fornix sont actuellement à l'essai (Leoutsakos et al., 2018; Rosenberg et al., 2015; White et al., 2021).

Les anomalies cérébrales chez les malades atteints de schizophrénie se produisent dans des régions appartenant au système limbique et les troubles de la mémoire épisodique sont l'un des phénotypes les plus constants chez ce type de patient (Kasai et al., 2004; J. Schaefer et al., 2013). Le fornix faisant partie du système limbique et étant impliqué dans la mémoire épisodique, plusieurs études se sont attachées à regarder, par différentes techniques, l'état du fornix chez des individus atteints de schizophrénie. Dans un premier temps l'analyse du fornix par des méthodes d'histologie classiques réalisées post-mortem ou bien par IRM n'ont conduit à l'observation d'aucune différence significative entre les patients et les sujets sains (Brisch et al., 2008; Zahajszky et al., 2001). En revanche le développement des méthodes de tractographie via l'IRM de diffusion (DTI) ont permis de mettre en évidence des perturbations au niveau de la morphologie du fornix chez des patients adultes et adolescents, avec une diminution du volume des fibres s'accompagnant d'une altération de la gaine de myéline qui entoure ces fibres (Abdul-Rahman et al., 2011; Fitzsimmons et al., 2014; Koshiyama et al., 2020). Ces anomalies

ont été corrélées à des déficiences de la mémoire épisodique via des tests de mémoire verbale et visuelle (Benear et al., 2020). Si la schizophrénie est considérée comme un trouble neurodéveloppemental, l'idée de l'apparition de composantes neurodégénératives au cours de la progression de ce type de pathologie a émergé il y a quelques années (Vita et al., 2012). Une partie des lésions axonales et de la démyélinisation du fornix observés chez les patients adultes pourraient également être dues à des mécanismes de dégénérescence dans cette région (Benear et al., 2020).

La souris MAP6 KO, un modèle d'étude de pathologies psychiatriques

Comme il l'a été mentionné précédemment dans cette introduction, la souris MAP6 KO présente une absence de développement du fornix post-commissural, qui est le défaut majeur à noter, bien que d'autres altérations de connectivités existent chez cette souris (Deloulme et al., 2015; Gimenez et al., 2017). Si la découverte de ce défaut anatomique est relativement récente, l'étude de la souris MAP6 KO est plus ancienne. Ces animaux présentent une fragmentation de l'activité normale s'accompagnant d'hyperactivité, un comportement de type anxieux important, ainsi que de déficits d'interaction sociale comme une altération du comportement maternel entraînant la mort des petits (Andrieux et al., 2002). Ces perturbations du comportement sont corrélées avec des modifications anormales du fonctionnement synaptique au cours du développement conduisant à des altérations de la plasticité synaptique (Andrieux et al., 2002). Ces défauts comportementaux et neurobiologiques sont corrigés par l'administration à long terme d'antipsychotiques, traitement couramment utilisé chez les patients atteints de schizophrénie. Ces résultats, renforcés par un nombre relativement important d'études réalisées par d'autres groupes, ont permis de considérer la souris MAP6 KO comme un modèle utile pour l'étude de la physiopathologie de la schizophrénie (Belzung & Lemoine, 2011; Delotterie et al., 2010; C. Jones et al., 2011).

Ces similitudes entre les mécanismes observés chez les patients atteints de schizophrénie et les souris MAP6 KO sont un argument important soutenant l'idée que l'étude des mécanismes régissant le développement du fornix chez la souris présente une piste de travail intéressante pour la compréhension de l'apparition de défauts de connectivité chez l'homme. De plus une étude datant de cette année a montré des homologues de structure et d'organisation très fortes entre le subiculum de la souris et celui de l'être humain, renforçant le fait qu'il est possible

d'effectuer un parallèle entre ces structures au cours du développement chez ces deux espèces (Bienkowski et al., 2021).

IV. La famille des Collapsin Response Mediator Proteins (CRMP)

IV. 1. Vue d'ensemble des CRMP

Les Collapsin Response Mediator Protein (CRMP1 à CRMP5) ont été découvertes par plusieurs groupes travaillant en parallèle dans différents domaines de recherche. En 1995, Minturn et al. identifient TOAD-64 (Turned On After Division MW 64 000 Da), une protéine dont l'expression augmente en abondance durant la corticogenèse, puis diminue ensuite à des niveaux très faibles chez l'adulte. Cette protéine est retrouvée dans les neurones postmitotiques lorsqu'ils commencent leur migration hors de la zone ventriculaire vers la plaque corticale en développement (Minturn et al., 1995). La même année, Goshima et ses collaborateurs caractérisent cette protéine comme étant impliquée dans la cascade de signalisation induite par la collapsine 1 (renommée par la suite sémaphorine 3A), une molécule inhibitrice du guidage axonal, dans les ganglions de la racine dorsale du poussin (DRG). Ils nomment cette protéine CRMP-62 pour Collapsin Response Mediator Protein, de masse moléculaire de 62 kDa (Goshima et al., 1995). En 1996, Wang et Strittmatter ont isolé plusieurs séquences génétiques chez le rat présentant de nombreuses similarités avec CRMP-62, et ainsi identifié les protéines CRMP 1 à 4, CRMP2 étant celle présentant le plus d'homologie avec CRMP-62 (L.-H. Wang & Strittmatter, 1996). Enfin au début des années 2000, un cinquième membre (CRMP5) a été ajouté à cette famille, impliqué lui aussi dans le guidage et la croissance des cellules nerveuses au cours du développement (Inatome et al., 2000). Depuis lors, ces protéines ont été largement étudiées et sont décrites dans la littérature sous différentes appellations en fonction de l'espèce animale dans laquelle elles ont été caractérisées. Nous concentrerons le développement de cette introduction principalement autour de CRMP1, 2 et 4.

IV. 2. Gènes et épissage

Les CRMP sont codées par cinq gènes différents mais présentent environ 75% d'homologies de séquences entre elles pour les CRMP1 à 4 et 50% entre CRMP5 et les autres membres de cette famille (Charrier et al., 2003). Les CRMP partagent 50% d'homologie (portion centrale des

CRMP) avec une protéine hépatique la dihydropyrimidase du foie, responsable de catabolisme de certains acides aminés, mais contrairement à celle-ci, elles n'ont pas conservé d'activité enzymatique (Hamajima et al., 1996; L.-H. Wang & Strittmatter, 1997). Les gènes codant pour les CRMP sont constitués de 14 exons (Kitamura et al., 1999; Torres & Polymeropoulos, 1998). Chez les mammifères, leur épissage conduit à l'expression de deux isoformes pour les CRMP 1, 2 et 4 : une forme courte et une forme longue pour laquelle une centaine d'acides aminés se substitue au fragment de 10 acides aminés en N-terminal (Leung et al., 2002; Quinn et al., 2003; Yuasa-Kawada et al., 2003). Bien que moins fortement exprimées, les formes longues ont été décrites comme essentielles dans certains mécanismes cellulaires et notamment dans la cascade de signalisation de la GTPase RhoA (Alabed et al., 2007a; Leung et al., 2002; Morgan-Fisher et al., 2013).

In vitro, les CRMP sont capables de s'associer et forment des homo-oligomères lorsqu'ils sont purifiés à partir du cerveau bovin (Deo et al., 2004; Stenmark et al., 2007; L.-H. Wang & Strittmatter, 1997). Des cations divalents tels que Ca^{2+} et Mg^{2+} ont été signalés pour favoriser la formation d'homotétramères de CRMP-2 en solution mais ont tendance à déstabiliser l'homotétramérisation de CRMP1 (Majava et al., 2008; Ponnusamy & Lohkamp, 2013). Cependant, toutes les CRMP ont montré, *in vivo*, une préférence pour la formation hétérotétramères par rapport aux homotétramères *in vivo*, les régions N-terminale et centrale (8-134 et 281-435) étant essentielles et suffisantes pour l'assemblage de cet état d'oligomérisation (Majava et al., 2008; Stenmark et al., 2007; L.-H. Wang & Strittmatter, 1997). La formation de ces complexes homotétramériques de CRMP2 ou hétérotétramériques entre CRMP1, 2 et 4 est régulée négativement par la phosphorylation de ces protéines (Rembutsu et al., 2008; Zheng et al., 2018). Le rôle de la formation de ces complexes est encore mal connu, cependant il a été montré que l'homotétramérisation de CRMP2 permet son interaction avec les microtubules et que sa dimérisation est impliquée dans la collapse du cône de croissance médié par la Sema3A (Morinaka et al., 2011; Niwa et al., 2017; Zheng et al., 2018). De plus, la conformation en tétramère de CRMP2 bloque sa capacité à être SUMOylée, une modification post-traductionnelle impliquée dans différents mécanismes qui seront développés dans la suite du manuscrit. (Myllykoski et al., 2017).

IV. 3. Modifications post-traductionnelles

IV. 3. 1. Phosphorylation

CRMP1, 2 et 4 possèdent toutes les 3 des sites de phosphorylation et différentes kinases sont responsables de l'ajout de groupements phosphate au niveau de ces sites (Figure 14). Cdk5 est capable de phosphoryler la sérine 522 de CRMP1, 2 et 4 mais seule CRMP4 peut également être phosphorylée au niveau de ce résidu par DYRK2 (Dual Tyrosine-Regulated Kinase 2). Cependant, il semblerait pourtant qu'*in vivo* un phénomène de compensation ait lieu en l'absence de Cdk5 et que CRMP2 puisse être phosphorylé par une autre kinase sans que celle-ci n'ait été pour le moment identifiée (A. R. Cole et al., 2004, 2006). Chez l'humain, cet ajout de phosphate sur la sérine 522 des CRMP permet d'amorcer la phosphorylation ultérieure de la sérine 518, la thréonine 514 et la thréonine 509 par une autre kinase, la GSK3 β (A. R. Cole et al., 2004, 2006). Pour CRMP1, la phosphorylation de la thréonine 509 pourrait également se faire directement par Cdk5. Chez les rongeurs, il a été montré que seul Cdk5 intervenait dans la phosphorylation de ce résidu thréonine 509, GSK3 β n'étant pas impliquée (A. R. Cole et al., 2006). D'autres études ont mis en évidence la phosphorylation de CRMP2 via la kinase Fyn au niveau de la tyrosine 32 et via ROCK ou CaMKII pour la thréonine 555 (Arimura et al., 2005; Hou et al., 2009; Sasaki et al., 2002; Uchida et al., 2009). *In vitro*, la kinase Fer est capable de phosphoryler les résidus tyrosine 479 et tyrosine 499, ce qui a pour effet d'empêcher la tétramérisation de CRMP2, diminuant ainsi son interaction avec les microtubules (Zheng et al., 2018). Si plusieurs kinases régulant la phosphorylation des CRMP ont été identifiées, très peu de données existent concernant les phosphatases impliquées dans la déphosphorylation de ces protéines. Il a été montré que CRMP2 pouvait être un substrat de la PP2A (Protéine Phosphatase 2A). Cette phosphatase est indispensable pour le développement neuronal et en particulier pour l'axonogénèse, un mécanisme au cours duquel PP2A déphosphoryle la thréonine 514 de CRMP2 (Zhu et al., 2010).

L'importance de la phosphorylation des CRMP par ces kinases a été particulièrement étudiée dans les mécanismes de polarisation neuronale, de croissance dendritique et de guidage axonal, notamment par la Sema3A (Uchida et al., 2005; Yamashita et al., 2012; Yoshimura et al., 2005). La phosphorylation de CRMP2 et 4 par la GSK3 β a aussi été décrite comme impliquée dans des mécanismes d'inhibition de la régénération axonale induite par la myéline (Alabed et

al., 2010; Liz et al., 2014). Certains mécanismes dépendants de la phosphorylation des CRMP seront abordés plus en détails dans les pages à venir.

IV. 3. 2. O-GlcNAcylation

Bien que majoritaire, la phosphorylation n'est pas la seule modification post-traductionnelle que les CRMP puissent subir (Figure 15). Cependant, ces autres modifications post-traductionnelles sont pour la plupart liées de manière plus ou moins directe à la phosphorylation. CRMP2, par exemple, peut subir une O-GlcNAcylation, ce qui consiste en l'ajout d'une N-acétylglucosamine sur une sérine ou une thréonine, dans le cytosol de synaptosome. Cette O-GlcNAcylation pourrait bloquer la phosphorylation de CRMP2 et ainsi jouer le rôle de niveau de régulation supplémentaire dans les processus cellulaires dépendant de la phosphorylation de CRMP2 (R. N. Cole & Hart, 2001). Plus récemment, il a été montré que la O-GlcNAcylation de CRMP2 sur la sérine 517 augmenterait avec l'âge et pourrait avoir un impact sur des fonctions cognitives en induisant des déficits de mémoire (Muha et al., 2019).

IV. 3. 3. SUMOylation

Les CRMP sont également toutes capables d'être sumoylées, l'ajout du peptide SUMO (Small Ubiquitin-like Modifier) ayant lieu au niveau de la lysine 374 (Figure 15) (Ju et al., 2013). Cette modification post-traductionnelle a été particulièrement étudiée chez CRMP2 et décrite comme jouant un rôle dans la régulation de l'activité des canaux ioniques voltages dépendants (Dustrude et al., 2017; Dustrude et al., 2013; Ju et al., 2013). La diminution de l'expression des canaux NaV1.7 induite par le blocage de la SUMOylation de CRMP2 permet d'inhiber les douleurs chroniques chez la souris ainsi que la capacité de CRMP2 à oligomériser (A Moutal et al., 2018). Les mécanismes de SUMOylation et de phosphorylation sur certains acides aminés spécifiques ont été mis en relation par des études montrant que la SUMOylation de CRMP2 dépend de sa phosphorylation préalable par Cdk5 et est à l'inverse bloquée par sa phosphorylation par Fyn (Baumann & Kursula, 2017; Dustrude et al., 2016). En revanche, les phénomènes de déSUMOylation chez CRMP2 et de déphosphorylation sur la thréonine 514 conduisent tous les deux à une stimulation de la croissance et de la maturation des épines dendritiques mais via des mécanismes indépendants (Zhang et al., 2018).

IV. 3. 4. Palmitoylation

CRMP2 est palmitoylée sur le résidu cystéine 248 qui est conservé chez CRMP1 et CRMP4, laissant penser que ces dernières pourraient elles aussi subir cette modification post-traductionnelle (Figure 15). Il est possible que cette palmitoylation influence, comme c'est le cas pour d'autres protéines, leur interaction avec des domaines membranaires (Yang et al., 2010). Une autre étude a montré que CRMP1 interagissait avec la PPT1 (Palmitoyl Protein Thioesterase), impliquée dans le métabolisme des lipides. Les auteurs suggèrent que cette enzyme pourrait jouer un rôle dans le guidage axonal en modulant la localisation intracellulaire de CRMP1 via sa dépalmitoylation (Scifo et al., 2015).

IV. 3. 5. Protéolyse

Enfin, les CRMP peuvent subir une protéolyse car tous les membres de cette famille sont des substrats des calpaïnes, des enzymes impliqués à la fois dans la plasticité synaptique mais aussi dans la neurodégénérescence (Wang et al., 2020). Les sites de clivage par ces enzymes varient selon les isoformes, ainsi que la fonction de ces différentes CRMP tronquées. Pour CRMP2, le clivage a lieu entre l'arginine 471 et la lysine 472 et pour CRMP4, au niveau de l'arginine 550 et de la sérine 551 (Figure 14) (Kowara et al., 2005; Rogemond et al., 2008). Le clivage de CRMP2 permettrait sa translocation au niveau du noyau via l'apparition d'un signal de localisation nucléaire et jouerait un rôle dans la régulation de la croissance neuritique au cours du développement (Rogemond et al., 2008). Cependant, la protéolyse des CRMP par les calpaïnes a été majoritairement étudiée dans des mécanismes d'excitotoxicité neuronale et de dégénérescence/régénération suite à des ischémies cérébrales qui seront également traités plus en détail dans la suite du manuscrit (Girouard et al., 2020; Jiang et al., 2007; Kowara et al., 2005; Yang et al., 2016; Zhang et al., 2007).

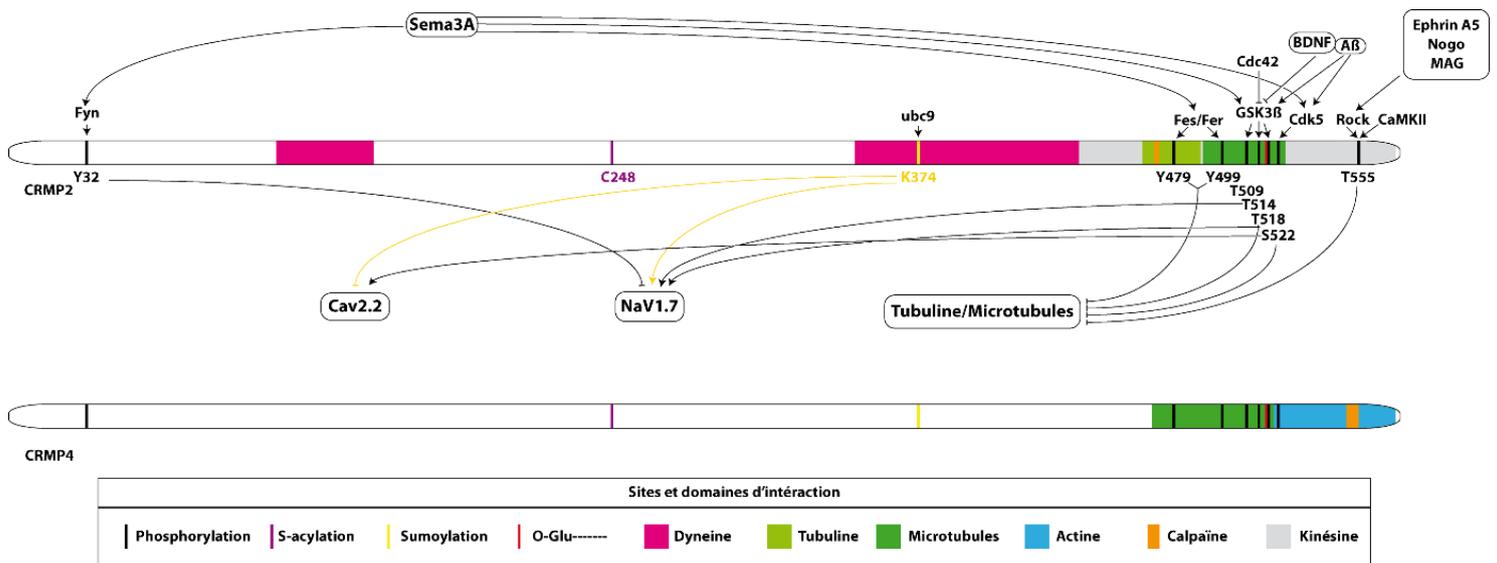


Figure 14 : Représentation schématique des domaines d'interaction de CRMP2 et CRMP4 avec leurs différents partenaires ainsi que les modifications post-traductionnelles subies par CRMP2. Tous les domaines d'interactions mentionnés dans ce manuscrit ne sont pas représentés sur ce schéma pour des raisons de clarté. Les sites au niveau desquels ces modifications ont été identifiées pour CRMP2 et qui sont conservés chez CRMP4 sont également mentionnés (schéma du bas)

IV. 4. Rôles des CRMP

IV. 4. 1. Expression tissulaire

IV. 4. 1. 1. Dans le système nerveux

Les CRMP sont retrouvées en quantité importante dans les cellules neurales au début de la vie embryonnaire. Leur expression atteint un pic autour de la première semaine postnatale et diminue considérablement chez les adultes (Minturn et al., 1995; Quinn et al., 2003; Wang & Strittmatter, 1996). Chaque CRMP affiche un modèle d'expression qui lui est propre. L'expression des CRMP au cours du temps n'est pas la même suivant l'isoforme dont il s'agit. Les formes longues de CRMP4 et CRMP2 sont détectées pendant des temps très courts, entre E15 et E18 pour CRMP4 et plutôt à partir de la naissance pour CRMP2 (Quinn et al., 2003). Chez l'adulte, les CRMP s'expriment notamment dans les zones qui subissent une neurogenèse et / ou une plasticité, comme le système olfactif, le cervelet et l'hippocampe (Byk et al., 1996; Charrier et al., 2003; Minturn et al., 1995; Nacher et al., 2000; Ricard et al., 2001; Tsutiya &

Ohtani-Kaneko, 2012; Wang & Strittmatter, 1996). In vitro, dans des neurones corticaux, CRMP1 et CRMP2 sont principalement exprimées dans les axones et, dans une moindre mesure, dans les régions somatodendritiques au bout de sept jours. À DIV 14, CRMP1 tend à se localiser dans la région présynaptique, tandis que CRMP2 se distribue dans les axones et les dendrites (Balastik et al., 2015; Makihara et al., 2016). CRMP1 et CRMP2 ont également été localisées au niveau des cônes de croissance dans les DRG (Higurashi et al., 2012). CRMP4 se distribue le long des axones et des dendrites des neurones hippocampiques. Elle est aussi présente dans les domaines périphériques et centraux des cônes de croissance où elle participe également à la formation de « bundle » d'actine-F au niveau des filopodes et à l'allongement des microtubules (Cha et al., 2016; Khazaei et al., 2014; Nakamura et al., 2020).

En dehors des neurones, CRMP2 est également exprimée dans les oligodendrocytes où elle favorise la rétraction réversible des prolongements de ces cellules en réponse à un stress oxydatif (Fernández-Gamba et al., 2012). Un immunomarquage de CRMP2 réalisé à partir de cerveau de rat a permis d'observer que cette protéine était exprimée à l'intérieur de la substance blanche du cervelet, ainsi qu'au niveau de la myéline de plusieurs tracts dont la moelle épinière (Ricard et al., 2000, 2001). Les ARNm de CRMP1 et 4 ont aussi été retrouvés dans les oligodendrocytes (Ricard et al., 2000). En revanche, la présence de ces protéines dans les astrocytes reste discutée, le peu de données existant sur le sujet amenant à des conclusions contradictoires (Kamata et al., 1998; Ricard et al., 2000; Yang et al., 2016). Il n'existe pas non plus d'éléments permettant d'affirmer ou non la présence des CRMP au niveau de la microglie (Moutal et al., 2019).

IV. 4. 1. 2. Dans les autres tissus

Bien que majoritairement présentes dans système nerveux central et périphérique, les CRMP sont également exprimées dans d'autres tissus. En effet, la présence d'ARNm de CRMP2 a été détectée dans le tissu pulmonaire de la souris fœtale et chez l'adulte pour l'homme ainsi que dans les monocytes au cours de leur maturation (Hamajima et al., 1996; Ito et al., 2000; Rouzaut et al., 2000; Wang & Strittmatter, 1996). CRMP1 et CRMP4 ont, elles, été décrites dans les testicules adultes (Byk et al., 1996; Kato et al., 1998). CRMP4 est également exprimée dans ostéoprogéniteurs, les cellules souches stromales dérivées de la moelle osseuse chez la souris (Abdallah et al., 2017).

Certaines CRMP ont été impliquées dans le développement des tissus cancéreux et peuvent avoir un effet sur la progression des métastases (Tan et al., 2014). CRMP1 et CRMP2 sont retrouvées dans le cancer du poumon, CRMP2 dans le cancer du sein et le cancer colorectal, CRMP1 et CRMP4 dans le cancer de la prostate et CRMP4 dans les tumeurs du pancréas, du côlon et dans le neuroblastome (Cai et al., 2017; Li et al., 2018; Lin et al., 2020; Oliemuller et al., 2013; Park et al., 2021; Shimada et al., 2014; Yazawa et al., 2020). L'expression des CRMP est, selon le type de cancer et le type d'isoforme, soit favorisée ou diminuée par rapport aux tissus sains. Des études récentes suggèrent que ces protéines pourraient donc servir de biomarqueurs potentiels de diagnostic et de pronostic dans l'apparition et le développement des cancers, mais également de cibles thérapeutiques dans le traitement de ces maladies (Li et al., 2016; Park et al., 2021; Tan et al., 2014; Yazawa et al., 2020; Zheng et al., 2018). Certains aspects du rôle joué par les CRMP et en particulier par CRMP4 dans les processus de développement et de migration des cellules tumorales peuvent avoir des éléments communs avec mécanismes mis en jeu dans les neurones au cours de la motilité des cônes de croissance (Li et al., 2018).

IV. 4. 2. Les CRMP dans la croissance neuritique et la régénération

IV. 4. 2. 1. Interaction avec le cytosquelette

Microtubules

Toutes les CRMP sont capables de se lier à la tubuline *in vitro* et *in vivo* (Fukata et al., 2002; Khazaei et al., 2014; Lin et al., 2011). Il a été suggéré que CRMP2, puissent se lier avec une affinité plus élevée aux dimères de tubuline plutôt qu'aux microtubules pré-assemblés, favorisant ainsi une co-polymérisation de microtubules avec CRMP2 (Fukata et al. 2002). Une autre étude réalisée par la suite montre, à l'inverse, que CRMP1 et 2 interagissent préférentiellement avec les microtubules déjà formés (Lin et al., 2011). Les auteurs expliquent cette contradiction avec la littérature antérieure à leurs travaux par les conditions expérimentales particulières qu'ils ont choisi d'utiliser. Cependant une étude plus récente a mis en évidence la capacité de CRMP2 à utiliser en réalité deux types de liaison distincts : une liaison aux dimères solubles de tubuline, via ses résidus 466 à 490 de la région C terminale, pour promouvoir la polymérisation des microtubules et une liaison aux microtubules

polymérisés pour les stabiliser grâce aux acides aminés 491 à 525 (Figure 14 et 15) (Niwa et al., 2017). Ce double rôle exercé par CRMP2 sur les microtubules est déterminant pour la formation des neurites et le développement de l'axone (Fukata et al., 2002; Niwa et al., 2017). CRMP4 est, elle aussi, impliquée dans des mécanismes dépendant de l'organisation des microtubules comme les cycles d'avancée, de pause et de rétraction des cônes de croissance, ainsi que dans l'élongation de l'axone (Khazaei et al., 2014). Cette interaction avec les microtubules a été identifiée comme se faisant via un domaine spécifique situé dans la région C terminale de CRMP4, au niveau des résidus 470 à 520 (Figure 14) (Khazaei et al., 2014).

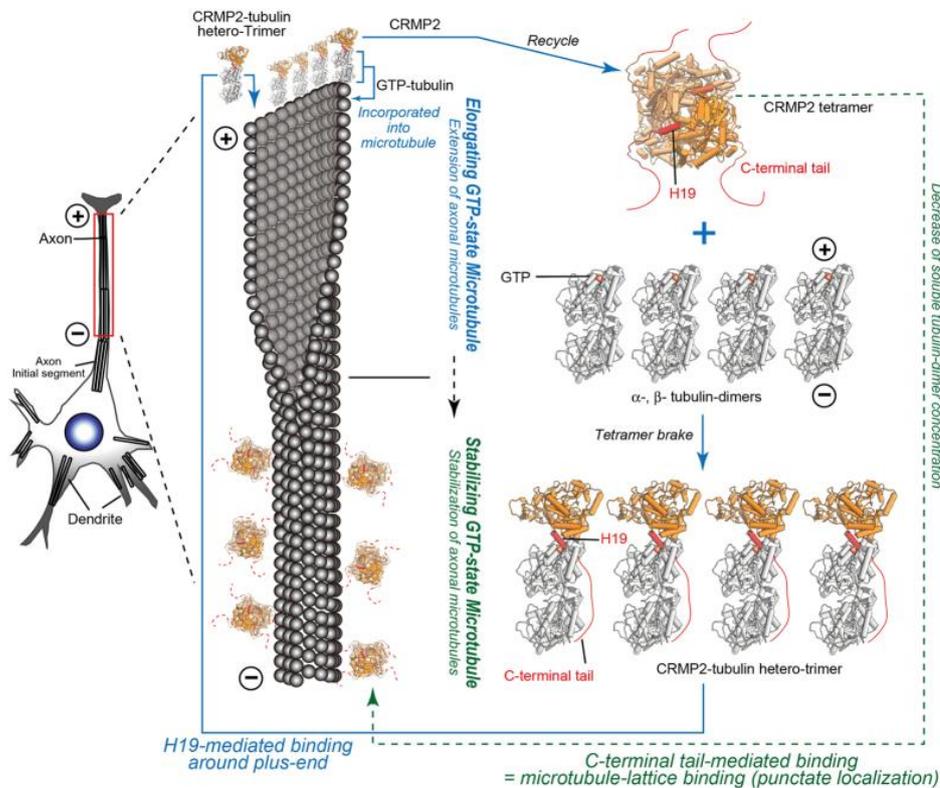


Figure 15 : Représentation schématique de la double fonction de CRMP2 sur l'élongation des microtubules et leur stabilisation d'après Niwa et al., 2017

Actine

Plusieurs études se sont intéressées aux liens entre l'actine et les différentes CRMP. En 2016 Yu-Kemp and Briehier ont montré que CRMP1 promouvait le branchement actine-F *in vitro* en présence du complexe de nucléation Arp2/3 mais l'année suivante une autre étude a suggéré, qu'*in vivo* dans des cellules cancéreuses, CRMP1 empêchait la formation de fibres de stress d'actine via l'inactivation d'Arp2/3 (Cai et al., 2017; Yu-Kemp & Briehier, 2016). Pour CRMP2, sa colocalisation avec l'actine a pu être observée au niveau des cônes de croissance de DRG (Arimura et al., 2005). L'interaction entre ces deux protéines pourrait se faire de manière indirecte, via le complexe Sra1/WAVE1 (Rac1-associated protein 1 (Sra-1) /WASP family verprolin-homologous protein 1), un régulateur du cytosquelette d'actine impliqué dans la croissance axonale (Kawano et al., 2005). CRMP4 favorise la formation d'actine-F *in vitro*, et *in vivo*, une surexpression de cette protéine stimule le développement des filopodes (Khazaei et al., 2014; Rosslenbroich et al., 2005). Le domaine impliqué dans l'interaction entre CRMP4 et l'actine a pu être caractérisé, il correspond aux 50 acides aminés situés à l'extrémité du C-terminal de la protéine (520 à 570) (Figure 15) (Cha et al., 2016; Khazaei et al., 2014).

IV. 4. 2. 2. Croissance axonale

La capacité des CRMP à interagir avec les microtubules et l'actine a été décrite comme étant essentielle dans les processus de développement de l'axone et dans la régulation de la morphologie du cône de croissance. En effet CRMP4 joue un rôle dans le remodelage du cône de croissance en induisant l'extension de filopodes dans les neurones hippocampaux via la formation d'actine-F. De plus, l'expression de CRMP4 sans ses domaines de liaison aux microtubules dans ces neurones chez la souris CRMP4 KO, n'est plus capable de restaurer l'élongation de l'axone comme le fait l'expression de la forme entière (Khazaei et al., 2014). Un phénomène similaire est observé avec CRMP2 qui, privé de sa capacité à interagir avec les microtubules, induit une diminution de la croissance, à l'opposé de ce qu'il est possible d'observer avec la protéine intacte (Brot et al., 2010; Fukata et al., 2002). La phosphorylation des CRMP, qui a déjà été abordée au cours de ce chapitre, influence leur capacité à se lier aux microtubules et par conséquent peut impacter leur rôle dans le développement des neurones. Plusieurs sites de phosphorylation des CRMP par différentes kinases se trouvent dans la région C-terminale correspondant au domaine d'interaction avec les microtubules (Figure 14). La

kinase GSK3 β phosphoryle CRMP2 sur la thréonine 514 et diminue ainsi sa capacité à se lier aux microtubules (Lin et al., 2011). En 2004, une étude avait montré que le blocage de la phosphorylation de CRMP2 par GSK3 β diminuait la stimulation de l'élongation axonale induite par CRMP2 (Cole et al., 2004). Cependant, l'année suivante, des travaux avaient à l'inverse, mis en évidence que la surexpression de CRMP2 non-phosphorylée/able sur ce résidu thréonine 514 stimulait la croissance des neurites et induisait la formation anormale de plusieurs axones (Yoshimura et al., 2005). Récemment, une étude allant dans ce sens a mis en évidence dans les neurones en culture que Cdc42 augmente la stabilité des microtubules en favorisant la déphosphorylation de CRMP2 sur la thréonine 514 via une inactivation de GSK-3 β (Li et al., 2021). Les auteurs suggèrent que c'est par ce mécanisme que Cdc42 participe à l'axonogénèse. CRMP2 est également phosphorylé par la kinase ROCK au niveau de la thréonine 555 bloquant ainsi son interaction avec les microtubules et diminue la croissance axonale (Arimura et al., 2005). En revanche, la phosphorylation de CRMP2 ne semble pas influencer sur sa capacité à interagir de manière directe avec l'actine (Arimura et al., 2005). A contrario, pour CRMP1, sa phosphorylation via Cdk5 induite par la Sema3A semble bloquer son interaction avec l'actine (Yao et al., 2016). Dans le cas de CRMP4, le lien entre phosphorylation et actine est indirect. En effet, CRMP4 possède la capacité à se lier à RhoA, connu pour être un régulateur clé de l'actine et cette interaction CRMP4/RhoA est dépendante de la phosphorylation par GSK-3 β (Alabed et al., 2007b, 2010).

IV. 4. 2. 3. Croissance axonale et molécules de guidage

Le rôle des CRMP a aussi été particulièrement étudié dans des phénomènes de croissance neuritique précis, en réponse à des molécules de guidage. En effet, dès 1995, Goshima et al. identifient CRMP2 comme un acteur essentiel de la signalisation Sema3A (Goshima et al., 1995). Il a été montré par la suite que l'utilisation d'ARN interférent de CRMP2 mais aussi de CRMP1 inhibe la croissance des cônes de croissance de neurones en culture (Uchida et al., 2005). Récemment CRMP2 a été impliquée dans la signalisation Sémaphorine 3F (Sema3F) permettant de réguler l'élagage des axones ainsi que dans leur rétraction (Ziak et al., 2020). Dans ces mécanismes de guidage, la phosphorylation des CRMP s'est révélée être un élément de régulation clé de l'activité et donc du rôle de ces protéines. En effet, le traitement de neurones DRG avec la Sema3A induit la phosphorylation séquentielle de CRMP2 par Cdk5 puis par GSK3 β , et bloque l'interaction de CRMP2 avec les microtubules. De plus la surexpression de

mutant CRMP2 non phosphorylable dans ces mêmes cultures engendre la suppression de la collapse des cônes de croissance en présence de Sema3A. La signalisation activée par cette molécule, essentielle dans le guidage axonal, est donc médiée par la phosphorylation de CRMP2 (Uchida et al., 2005). D'autres études ont mis en évidence, dans cette même signalisation Sema3A, le rôle joué par la phosphorylation de CRMP2 via la kinase Fyn au niveau de la tyrosine 32 (Sasaki et al., 2002; Uchida et al., 2009). Il a également été montré, dans un système de signalisation Sema3A reconstitué dans des cellules COS-7, que CRMP1, CRMP2 et CRMP4 interagissaient, lors d'expériences d'immunoprécipitation, avec la PlxA1, le récepteur de la Sema3A (Deo et al., 2004). De plus, cette molécule de guidage active la kinase Fes via son récepteur la PlxA1 ce qui induit la phosphorylation de celle-ci ainsi que des CRMP1, 2 et 4 et la contraction des cellules COS-7 (Mitsui et al., 2002). Ces études suggèrent un lien entre les récepteurs des molécules de signalisation et les CRMP passant par des processus de phosphorylation.

La Sema3A mise à part, il existe également l'éphrine A5 et l'acide lysophosphatidique qui induisent la phosphorylation de CRMP2 par la kinase ROCK sur la thréonine 555 cette fois ci, phosphorylation nécessaire à la collapse induite par ces molécules de guidage (Arimura et al., 2000, 2005). Le BDNF et la neurotrophine régulent aussi la phosphorylation de CRMP2 mais au niveau du résidu thréonine 514 via l'inhibition de GSK3 β ce qui conduit à l'élongation et au branchement axonal (Yoshimura et al., 2005).

IV. 4. 2. 4. Croissance dendritique

Outre les processus de croissance axonale, les CRMP ont été également impliqués dans la mise en place des dendrites via des mécanismes similaires.

La génération de souris invalidées pour le gène codant pour CRMP1 a permis de mettre en évidence une malformation des dendrites au niveau de la couche CA1 de l'hippocampe chez ces animaux (Su et al., 2007). La stimulation de la croissance des épines dendritiques des neurones corticaux dépendante de la Sema3A passerait par une phosphorylation de CRMP1 par Cdk5 (Chua et al., 2021; Yamashita et al., 2007). La phosphorylation de CRMP2 par cette même kinase sur la sérine 522 a aussi été impliquée dans l'organisation correcte des projections dendritique (Yamashita et al., 2012). Les kinases GSK3 α et β , largement caractérisées dans les phénomènes de croissance axonale, ont été également décrites comme

régulant toutes les deux négativement le développement des dendrites des neurones granulaires du cervelet via la phosphorylation de CRMP2 (Tan et al., 2013). L'expression de mutant de CRMP2 non phosphorylable au niveau des résidus sérine 522 et thréonine 509 conduit à l'apparition de dendrites à la morphologie particulière qui correspond à ce que les auteurs appellent le « curling phénotype » (Yamashita et al., 2012). Ceux-ci suggèrent que le rôle de CRMP2 dans le développement dendritique pourrait être dû seulement en partie à une signalisation Sema3A, le « curling phénotype » n'ayant pas été observé dans des neurones Sema3A KO en culture. Pour ce qui relève de la Sema3A, CRMP2 interagit physiquement avec la PlxA3, le récepteur de la Sema3A, qui est elle aussi enrichie au niveau des dendrites, pour assurer la médiation de la croissance dendritique régulée par cette molécule de guidage (Jiang et al., 2020). Au niveau des neurones de l'hippocampe, la phosphorylation de CRMP2 a été impliquée dans la régulation de la bifurcation proximale des dendrites apicales des neurones pyramidaux de la couche CA1 au cours du développement. CRMP4 joue également un rôle dans ce mécanisme en supprimant cette bifurcation dendritique sous le contrôle d'une signalisation Sema3A. Chez les neurones CRMP4 KO, l'ajout de Sema3A ne stimule plus la longueur totale des dendrites, ni le nombre de branchements par rapport aux neurones WT. En revanche l'absence de CRMP4 induit, sans traitement à la Sema3A, une augmentation du nombre de branchements mais sans que la longueur dendritique totale ne soit impactée (Niisato et al., 2012). Cependant, un autre article publié quelques années après, a montré qu'une surexpression de CRMP4 augmente la longueur dendritique totale, la densité des épines ainsi la fréquence des courants synaptiques excitateurs miniatures au niveau de ces structures. Les auteurs concluent que CRMP4 favorise donc la croissance et la maturation des dendrites et montre que son action passe par le cytosquelette d'actine (Cha et al., 2016). CRMP4 contribue aussi à l'organisation de la couche de cellules mitrales du bulbe olfactif en régulant négativement l'élongation des dendrites (Tsutiya et al., 2016). CRMP4 est donc un élément nécessaire au développement et à la maturation des dendrites, son rôle dans la régulation de ces mécanismes semble être dépendant du type cellulaire observé et encore sujet à controverse. Enfin, CRMP2 a récemment été impliquée pour la première fois dans la morphogénèse dendritique sous le contrôle d'une autre sémaphorine, la sémaphorine 3F. En effet les souris CRMP2 KO et Sema3F KO présentent la même densité anormalement élevée d'épines dendritiques au niveau des neurones granulaires de l'hippocampe et dans des cultures traitées à la sémaphorine 3F, l'absence de CRMP2 conduit à une altération de « l'élagage » des dendrites (Ziak et al., 2020).

IV. 4. 2. 5. Liens fonctionnels entre les CRMP dans les mécanismes de régulation de la croissance neuritique

Les CRMP partagent entre elles un pourcentage d'homologie élevé, sont les substrats de mêmes kinases comme Cdk5 et GSK3 β et sont impliqués dans des mécanismes biologiques similaires de croissance neuritique. Plusieurs études se sont attachées à essayer de comprendre s'il existait des phénomènes de compensation entre isoformes et à l'inverse quels étaient les rôles propres à une CRMP qui ne seraient pas partagés avec les autres membres de cette famille.

Les équipes de Y. Goshima et T. Ohshima se sont concentrées sur le développement et l'organisation des dendrites au sein du cortex, de l'hippocampe ou encore du cervelet dans des animaux présentant différentes combinaisons de mutation chez CRMP1, CRMP2 et CRMP4. Une souris CRMP2 KI dont le gène de CRMP2 a été remplacé par un gène codant pour cette même protéine mais mimant une phosphorylation constitutive a été générée par ce laboratoire. Un pourcentage plus élevé de neurones corticaux ayant une élongation dendritique irrégulière, avec l'apparition de boucles, est observé dans des cultures issues cette souris par rapport à des neurones de souris sauvage. Ce « curling phénotype », comme l'ont baptisé les auteurs, se retrouve également chez les souris CRMP1 KO. Chez les doubles mutants CRMP2 KI CRMP1 KO une augmentation plus importante du nombre de ces dendrites est remarquée par rapport aux simples mutants CRMP2 KI et CRMP1 KO. *In vivo* l'étude des neurones pyramidaux de la couche V du cortex a montré des résultats allant dans le même sens que ceux observés en culture. Les souris CRMP2 KI CRMP1 KO présentent, au niveau de cette région du cerveau, des neurones arborant plus de dendrites primaires ainsi qu'une orientation de celles-ci, au sein de la couche V, altérée par rapport aux souris sauvages mais également par rapport aux simples mutants CRMP1 KO et CRMP2 KI chez qui le défaut est moins fort. Les auteurs concluent que le phénotype observé chez le double mutant ne résulte pas seulement des effets additionnés de l'absence de CRMP1 et de la présence d'une protéine CRMP2 phosphomimétique, mais que CRMP1 et CRMP2, via sa phosphorylation, ont un effet synergique sur le développement et l'organisation des dendrites du cortex (Yamashita et al., 2012). La même équipe s'est ensuite intéressée au rôle de ces protéines dans la signalisation Sema3A qui est impliquée dans la morphogénèse dendritique. Chez les souris Sema3A KO, la longueur des dendrites basales des neurones pyramidaux de la couche 5 est diminuée par rapport aux souris contrôles (Makihara et al., 2016). Le même phénotype est retrouvé chez les souris CRMP1 KO, chez les double hétérozygotes CRMP1^{+/-}Sema3A^{+/-} ainsi que chez les doubles hétérozygotes CRMP2^{+/-}Sema3A^{+/-}.

mais pas chez les animaux CRMP2 KO ou CRMP1^{+/-}CRMP2^{+/-}. Les mêmes animaux que ceux ayant des modifications de la longueur des dendrites présentent également une diminution de la densité des épines dendritiques, à la différence près que ce paramètre-là est aussi modifié chez les souris CRMP2 KO. Ces résultats montrent l'existence d'une interaction génétique entre Sema3A et CRMP1 ainsi qu'entre Sema3A et CRMP2 dans la régulation de la maturation et la configuration des épines dendritiques mais que l'action respective de CRMP1 et CRMP2 passe par des voies distinctes (Makihara et al., 2016). Chez les souris CRMP4 KO, une perturbation de la ramification des dendrites des neurones pyramidaux du cortex avec une augmentation de leur longueur et du nombre d'intersection ainsi qu'une modification de leur orientation est observée (Takaya et al., 2017). Ces résultats rejoignent ceux obtenus et décrits plus haut pour les souris CRMP1 KO, cependant, contrairement à CRMP1, le rôle de CRMP4 dans le développement des dendrites dans le cortex ne semble pas être lié à la Sema3A (Takaya et al., 2017; Yamashita et al., 2012). L'absence de CRMP1 ou de CRMP4 induit également augmentation de la proportion de neurones pyramidaux de la CA1 de l'hippocampe, qui, par rapport à des neurones sauvages, présentent une bifurcation distale de leurs dendrites (Niisato et al., 2012; Takaya et al., 2017). Le double mutant CRMP4 KO/CRMP1 KO affiche des défauts de même type mais son phénotype est plus sévère que celui observé chez les simples mutants CRMP4 KO ou CRMP1 KO. Bien que ces résultats semblent amener aux mêmes conclusions que celles de l'étude de Yamashita sur le rôle de CRMP1 et CRMP2, à savoir qu'un phénotype plus drastique chez un double mutant par rapport à ce qui peut être observé chez les deux simples mutants tend à montrer un effet synergique des deux protéines en question, Takaya et al. concluent que CRMP1 et CRMP4 ont des rôles redondants dans l'établissement des dendrites (Takaya et al., 2017; Yamashita et al., 2012). CRMP4 a aussi été impliquée dans la bifurcation des dendrites dans l'hippocampe. L'absence de CRMP4 n'impacte pas l'élongation basale (en l'absence de toute molécule de guidage) de dendrites de l'hippocampe, en revanche, les neurones de cette région CRMP4 KO ne voient plus leur croissance stimulée par la présence de Sema3A. CRMP4 a donc elle aussi été impliquée dans la régulation de la bifurcation des dendrites apicales des neurones de l'hippocampe mais son absence n'impacte pas l'élongation basale des dendrites dans des cultures de neurones provenant de cette région du cerveau. En revanche les auteurs ont noté une absence de réponse des neurones hippocampaux CRMP4 KO à une stimulation de la croissance des dendrites et du nombre de branchements par la Sema3A (Niisato et al., 2012). Ces observations peuvent paraître contradictoires au regard des résultats de Takaya faisant état de l'absence de lien entre CRMP4 et la Sema3A dans le développement des dendrites des neurones corticaux. Cependant, ces

résultats peuvent suggérer que CRMP4 pourraient en réalité avoir deux rôles distincts dans le développement des dendrites, l'un en lien avec la Sema3A et l'autre non (Niisato et al., 2012). L'année suivante les mêmes auteurs publient une étude similaire dans laquelle ils regardent cette fois-ci l'impact de la présence de CRMP2 phosphomimétique combinée à l'absence de CRMP4. Ces souris CRMP2 KI/CRMP4 KO présentent des défauts accrus de l'organisation des bifurcations dendrites par rapport à ceux observés chez les CRMP4 KO (Niisato et al., 2012, 2013). In vivo, la mutation phosphomimétique de la souris CRMP2 KI seule n'impacte pas le développement des dendrites de l'hippocampe, en revanche *in vitro* la présence de CRMP2 phosphomimétique dans les neurones en culture induit une augmentation de la longueur totale des dendrites et du nombre de branchements par rapport au contrôle. Ce mutant CRMP2 KI inverse également la réponse des neurones à la sema3A, puisque l'ajout de cette molécule engendre une diminution de la taille des dendrites et de leurs ramifications à l'opposé de ce qui est observable chez le contrôle. Ces effets sont accentués chez le double mutant CRMP2 KI/CRMP4 KO (Niisato et al., 2013).

	Cortex neurones pyramidaux couche V	Cortex signalisation Sema3A	Hippocampe neurones pyramidaux CA1	Hippocampe signalisation Sema3A
CRMP1 KO	"curling phénotype" augmentation du nombre de dendrites primaires et défauts d'orientation au sein de la couche V	diminution de la longueur des dendrites basales et de la densité des épines dendritiques	bifurcation distale des dendrites	
CRMP2 KI	"curling phénotype" augmentation du nombre de dendrites primaires et défauts d'orientation au sein de la couche V		pas d'impact in vivo augmentation de la longueur et du branchement des dendrites in vitro	inversion de l'effet de la Sema3A: diminution de la longueur et du branchement des dendrites
CRMP1 KO/CRMP2 KI	"curling phénotype" augmentation du nombre de dendrites primaires et défauts d'orientation au sein de la couche V +++			
CRMP1 +/- Sema3A +/-		diminution de la longueur des dendrites basales et de la densité des épines dendritiques		
CRMP2 +/- Sema3A +/-		diminution de la longueur des dendrites basales et de la densité des épines dendritiques		
CRMP2 KO		diminution de la densité des épines dendritiques		
CRMP4 KO	augmentation de la longueur et du branchement des dendrites	pas de lien	pas d'impact sur l'élongation basale des dendrites bifurcation distale des dendrites	blocage de la stimulation de la croissance et de la ramification des dendrites
CRMP1 KO/CRMP4 KO			bifurcation distale des dendrites +++	
CRMP2 KI/CRMP4 KO			bifurcation distale des dendrites +++	inversion de l'effet de la Sema3A: diminution de la longueur et du branchement des dendrites +++
CRMP1 KO/CRMP2 KI /CRMP4 KO	"curling phénotype" défaut de migration des neurones pyramiaux		défaut de migration des neurones de la CA1	

Figure 16 : Tableau synthétisant les résultats des articles Yamashita et al. 2012, Makiara et al. 2016, Takaya et al. 2017, Niisato et al. 2012, 2013 et Yamazaki et al. 2021, traitant des rôles des CRMP dans le développement et l'organisation des dendrites dans le cortex et l'hippocampe

D'autres travaux se sont penchés sur la caractérisation des similitudes et des différences entre les rôles joués par les CRMP non plus au niveau des dendrites mais dans le cône de croissance et l'axone. CRMP2 et CRMP1 ont toutes les deux été retrouvées au niveau du cône de croissance mais localisées dans régions différentes. CRMP1 est située dans le domaine périphérique (Figure 1), colocalisée avec actine alors que CRMP2 est présente plutôt dans le domaine central (Figure 1), riche en microtubules. L'inactivation focale localisée au cône de croissance de CRMP1 diminue la taille de cette structure et modifie sa morphologie, ce qui n'est pas observé en l'absence de CRMP2. De plus, l'inhibition de CRMP1 ou CRMP2 induit une rotation du cône de croissance dans des directions opposées. En revanche l'absence de l'une ou l'autre de ces deux CRMP bloque la croissance neuritique. Les auteurs concluent que si ces deux protéines sont impliquées dans le comportement du cône de croissance, le rôle de CRMP1 passerait plutôt par une modulation du cytosquelette d'actine alors que CRMP2 régulerait les microtubules (Higurashi et al., 2012). Contrairement à CRMP2 et CRMP1, CRMP2 et CRMP4 sont colocalisées dans le cône de croissance. L'inhibition de CRMP4 induit, comme l'inhibition de CRMP1, le rétrécissement de la surface du cône de croissance et inhibe la croissance axonale. Les auteurs montrent que ces défauts sont accentués lorsque l'absence de CRMP2 est couplée à celle de CRMP4. La surexpression de CRMP2 permet de compenser l'absence de CRMP4 et de restaurer la morphologie du cône de croissance ainsi que l'induction de la croissance axonale, bien que cet effet ne soit que partiel. A l'inverse, une surexpression de CRMP4 associée à une inhibition de CRMP2 n'induit pas une augmentation de la taille du cône de croissance, comme il est possible de l'observer lors d'une surexpression de CRMP4 seule, mais restaure le phénotype contrôle. CRMP4 et CRMP2 semblent avoir des rôles qui se rejoignent et peuvent se compenser, du moins partiellement, dans la régulation du développement du cône de croissance et des axones (Tan et al., 2015). Enfin, les souris CRMP1 KO/CRMP2 KI/CRMP4 KO présentent des perturbations de la migration cellulaire entraînant des altérations de l'organisation du cortex et de l'hippocampe qui n'avaient pas été observées chez les souris arborant des mutations pour une ou deux de ces protéines seulement (Yamazaki et al., 2021).

	Localisation dans le cône de croissance	Inhibition	Surexpression
CRMP1	domaine périphérique, colocalisation avec l'actine	diminution de la taille du cône de croissance et modification de sa morphologie rotation du cône de croissance dans la direction opposée à la région où est exercée l'inhibition blocage de la croissance neuritique	
CRMP2	domaine central, colocalisation avec les microtubules	rotation du cône de croissance dans la direction de la région où est exercé l'inhibition blocage de la croissance neuritique	restauration de la morphologie du cône de croissance induite par l'absence de CRMP4
CRMP4	domaine central, colocalisation avec les microtubules	diminution de la taille du cône de croissance et modification de sa morphologie blocage de la croissance axonale	augmentation de la taille du cône de croissance sauf si couplée à l'inhibition de CRMP2

Figure 17 : Tableau synthétisant les articles Higurashi et al. 2012 et Tan et al. 2015 portant sur le rôle des CRMP dans la régulation de la morphologie du cône de croissance

Enfin une colocalisation de CRMP1, CRMP2 et CRMP4 a été observée dans les cellules de Purkinje du cervelet. Les souris CRMP2 KI/CRMP1 KO/CRMP4 KO arborent une migration et un alignement anormal de ces cellules au cours du développement plus drastique que le phénotype observé chez les simples mutants ou chez les souris présentant des combinaisons de double mutation. Ces défauts neuroanatomiques sont corrélés avec des défauts de coordination motrice. Les auteurs concluent qu'il existe un phénomène de redondance entre les différentes CRMP dans ces mécanismes (Yamazaki et al., 2020).

Les CRMP1, CRMP2 et CRMP4 semblent donc pouvoir jouer des rôles similaires, l'inhibition de l'une pouvant être compensée par la surexpression d'une autre isoforme et l'absence de plusieurs CRMP conduisant à des phénotypes plus drastiques que ce qui peut être observé lorsque seule une isoforme n'est pas exprimée. Cependant, suivant le type de neurones ou le mécanisme observé, s'il s'agit du développement du cône de croissance ou de celui des dendrites ou encore s'il s'agit de caractériser l'effet d'une CRMP par rapport à une signalisation Sema3A, des spécificités apparaissent entre les différents membres de cette famille.

IV. 4. 2. 6. Régénération axonale

Outre dans ces mécanismes développementaux, les CRMP ont plus récemment été retrouvées mises en jeu dans des phénomènes faisant suite à une lésion au niveau du système nerveux central ou périphérique. Une augmentation de l'expression de CRMP1 et 2 après une affection d'un nerf moteur crânien, le nerf hypoglosse a été constatée. La protéine CRMP2 nouvellement synthétisée est transportée à extrémité distal de l'axone lésé, et une surexpression CRMP2 promeut la régénération (Suzuki et al., 2003). CRMP4 a, elle aussi, été impliquée dans ce mécanisme mais pour le nerf sciatique. La stimulation de son expression est induite par le CTNF

(Ciliary Neurotrophic Factor), un facteur essentiel pour la survie et la régénération axonale après une altération au niveau du système nerveux périphérique (Jang et al., 2010). Plus récemment, une étude a montré que CRMP4 jouait en réalité un double rôle dans les mécanismes faisant suite à une lésion. En effet, elle serait nécessaire à la fois pour la régénération de l'axone mais elle serait également impliquée dans la dégénérescence du segment distal détaché, via son clivage par la calpaïne (Girouard et al., 2020).

A l'inverse, dans le système nerveux central pour lequel la régénération est entravée par les propriétés intrinsèques qui le constituent mais également par des facteurs extrinsèques, certaines CRMP agiraient en bloquant la repousse neuronale. Une étude récente a permis de montrer que, dans des neurones corticaux, la présence du facteur extrinsèque Nogo-A induisait une interaction entre son récepteur NgR1, la PlxA2 et CRMP2 et à terme le blocage de la régénération suite à une lésion (Sekine et al., 2019). Comme pour la croissance axonale, il a été montré que différents mécanismes touchant à la régénération et impliquant les CRMP sont dépendant de la phosphorylation/déphosphorylation de celles-ci. En effet, CRMP2 par exemple, est phosphorylée par la ROCK sur la thréonine 555, en aval d'une signalisation induite par MAG (Myelin-Associated Glycoprotein) ou Nogo qui sont des inhibiteurs de la régénération associés à la myéline (MAI), des facteurs extrinsèques aux neurones sécrété après une lésion au niveau du système nerveux central (Figure 18). L'expression de CRMP2 non-phosphorylable au niveau de ce résidu bloquerait l'effet inhibiteur de MAG sur l'élongation des neurites sur des neurones du cervelet en culture. Les auteurs suggèrent que la phosphorylation de CRMP2 pourrait induire son inactivation et l'empêcher ainsi de favoriser l'assemblage des microtubules, un processus nécessaire à la régénération axonale (Mimura et al., 2006). Une autre étude a mis en évidence un mécanisme similaire initié par un autre type d'inhibiteur de la croissance, l'anticorps anti-ganglioside impliqué dans des neuropathies immunes, passant lui aussi par la voie RhoA/ROCK et par la phosphorylation de CRMP2 (Rozés Salvador et al., 2016). Après une lésion l'inactivation de la voie GSK3 β -CRMP-2 dans des souris dont l'activité de la GSK3 β est inhibée, améliore la régénération des axones à travers la cicatrice gliale via une augmentation de la vitesse de croissance des microtubules (Liz et al., 2014). Outre la régulation de la régénération à proprement parler CRMP2 a récemment été impliquée dans le phénomène de dégénérescence aiguë des axones suite à une lésion via son clivage par la calpaïne, comme cela avait été observé pour CRMP4 dans le système nerveux périphérique (Girouard et al., 2020; J. N. Zhang et al., 2016). CRMP4 a aussi été décrite dans des signalisations conduisant au blocage de la régénération du système nerveux central. En effet,

MAG voit son action inhibée en l'absence de CRMP4 mais cette dernière est requise également pour l'effet protecteur de MAG contre la dégénération axonale (Nagai et al., 2012). L'action de Nogo est aussi dépendante de CRMP4. En effet Nogo va favoriser l'interaction entre CRMP4 et RhoA et induire un blocage de la repousse des axones après une lésion. Ce complexe se forme au niveau des cônes de croissance et inhiberait l'élongation axonale en agissant potentiellement sur le cytosquelette d'actine (Alabed et al., 2007b). Les mêmes auteurs se sont intéressés, eux aussi, quelques années plus tard à la kinase GSK3 β et à son implication dans les processus de régénération. En effet l'interaction entre CRMP4 et RhoA ne peut avoir lieu que si Nogo se lie à son récepteur, induit la phosphorylation de GSK3 β , qui devient inactive et qui n'est plus capable de phosphoryler CRMP4, conduisant ainsi à une augmentation de la proportion de CRMP4 non phosphorylée et capable d'interagir avec RhoA (Alabed et al., 2010). Dans ce contexte de signalisation la, il semble donc, qu'à l'inverse de ce qui a été précédemment décrit pour CRMP2, ce soit la forme non phosphorylée de CRMP4 qui participe au blocage de la régénération axonale. Plus récemment, il a été montré qu'après une lésion au niveau de la moelle épinière, l'expression de CRMP4 augmentait et qu'à l'inverse chez des souris CRMP4 KO, une régénération des nerfs moteurs et sensitifs était observable (Nagai et al., 2015, 2016). Dans ces articles, les auteurs mettent en évidence l'implication de CRMP4 dans la signalisation d'une autre famille d'inhibiteurs de la régénération, les CSPG (Chondroïtin Sulfate Proteoglycans). Ce mécanisme passe lui aussi par la GSK3 β et la régulation de la phosphorylation de CRMP4.

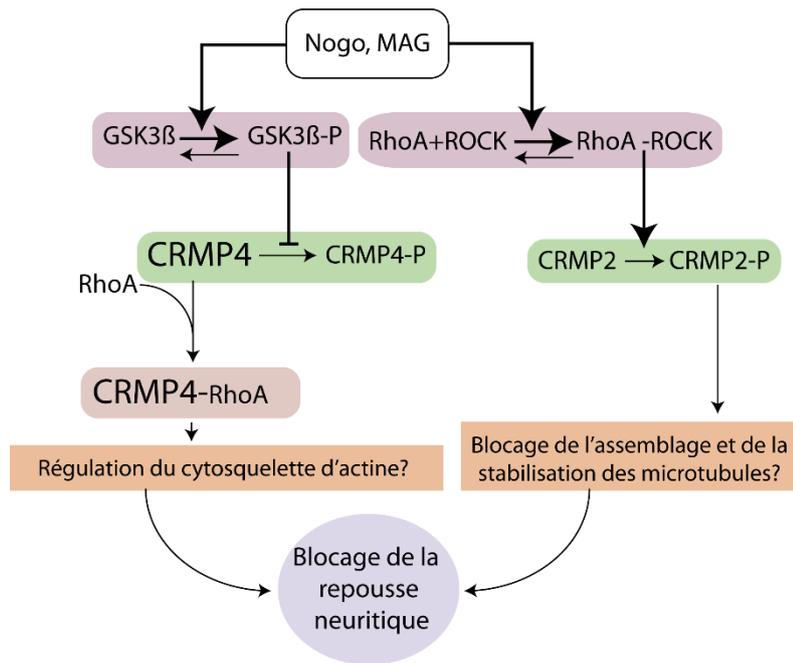


Figure 18 : Représentation schématique du rôle joué par CRMP2 et CRMP4 dans l'inhibition de la repousse neuritique induite par les MAI Nogo et MAG après une lésion au niveau du système nerveux central d'après Mimura et al. 2006, Alabed et al. 2007 et 2010 et Nagai et al. 2012

Les différents travaux qui viennent d'être cités tendent à montrer que les CRMP agissent comme des phosphoprotéines de signalisation modulant l'organisation du cytosquelette. Les CRMP pourraient faire partie des protéines qui jouent un rôle dans l'interaction entre les microtubules et l'actine de par leur capacité à interagir avec l'un et l'autre, interaction fondamentale pour de nombreux processus cellulaires, tels que la motilité cellulaire, le guidage des cônes de croissance, la croissance et la rétraction des neurites (voir partie motilité cône de croissance) (Tan et al., 2015).

IV. 4. 2. 7. Les CRMP et la régulation des courants ioniques

En dehors de leurs rôles dans des processus de morphogénèse neuronale et de régénération, les CRMP peuvent également participer à la transmission synaptique et à la plasticité neuronale.

Les canaux calciques CaV2.2 constituent la principale source d'afflux de calcium nécessaire au relargage de neurotransmetteur au niveau des synapses immatures du SNC. CRMP2 se lie à ces canaux via trois séquences CBD (CaV Binding Domains) correspondant aux acides aminés 94 à 166, 212 à 297 et 479 à 500, liaison qui dépend de la phosphorylation de CRMP2 par la

kinase Cdk5 (Brittain et al., 2009, 2012). Cette interaction est impliquée dans l'augmentation de l'expression de surface des CaV2.2., amplifiant la densité des courants calciques présynaptiques, couplée à un relargage accru de neurotransmetteur et induisant une augmentation de la taille du bouton présynaptique (Brittain et al., 2009; Chi et al., 2009). A l'inverse de ce qui a été montré pour la phosphorylation, la SUMOylation de CRMP2 induirait le blocage de l'afflux de calcium (Ju et al., 2013). Les auteurs suggèrent que ces deux modifications post-traductionnelles pourraient agir comme un « switch moléculaire » régulant la liaison de CRMP2 avec les CaV2.2. Cependant il a également été montré par la suite que la SUMOylation de CRMP2 ne peut avoir lieu sans une phosphorylation préalable de la protéine par Cdk5 (Figure 19) (Dustrude et al., 2016). Les canaux CaV2.2 ont été retrouvés dans des phénomènes de douleur chronique suite à des lésions nerveuses ou à certains traitements anti-cancéreux. L'utilisation d'un peptide correspondant aux domaines CBD de CRMP2 et bloquant l'interaction de la CRMP2 endogène avec les CaV2.2 a permis d'observer une diminution significative des courants calciques, une diminution du relargage de neurotransmetteurs et une suppression l'hypersensibilité neuropathique (Brittain et al., 2011). CRMP2 est également capable d'interagir avec un autre type de canal, les canaux sodiques voltages dépendant NaV1.7 responsables de l'excitabilité neuronale et présents au niveau post-synaptique. Cette liaison est dépendante de la SUMOylation de CRMP2, son blocage empêchant l'interaction de CRMP2 avec les NaV1.7, diminue l'adressage de ces canaux à la membrane et réduit l'excitabilité neuronale (Dustrude et al., 2016; François-Moutal et al., 2018). Ces canaux sodiques étant eux aussi impliqués dans la nociception, l'étude du rôle de CRMP2 dans l'adressage des NaV1.7 et au même titre que pour celui des CaV2.2, ouvre des perspectives intéressantes pour le traitement des douleurs chroniques. Récemment une équipe a montré que l'injection intrathécale (au niveau des méninges) d'un peptide bloquant la SUMOylation de CRMP2 permet de diminuer chez le rat l'hypersensibilité thermique et mécanique induite par une lésion nerveuse, sans sédation ni trouble moteur (François-Moutal et al., 2018). Une autre isoforme de CRMP, CRMP1 a été retrouvée colocalisée avec les canaux NaV1.7 dans des neurones de DRG traités à la Sema3A. La régulation de la croissance dendritique dans ces neurones passe, entre autres, par le transport rétrograde de la PlxA4, un récepteur de la Sema3A, le long des axones. CRMP1, via un mécanisme dépendant de sa phosphorylation, est capable de moduler l'activité de ces

canaux dont dépendant le transport rétrograde induit par la Sema3A (Yamane et al., 2017).

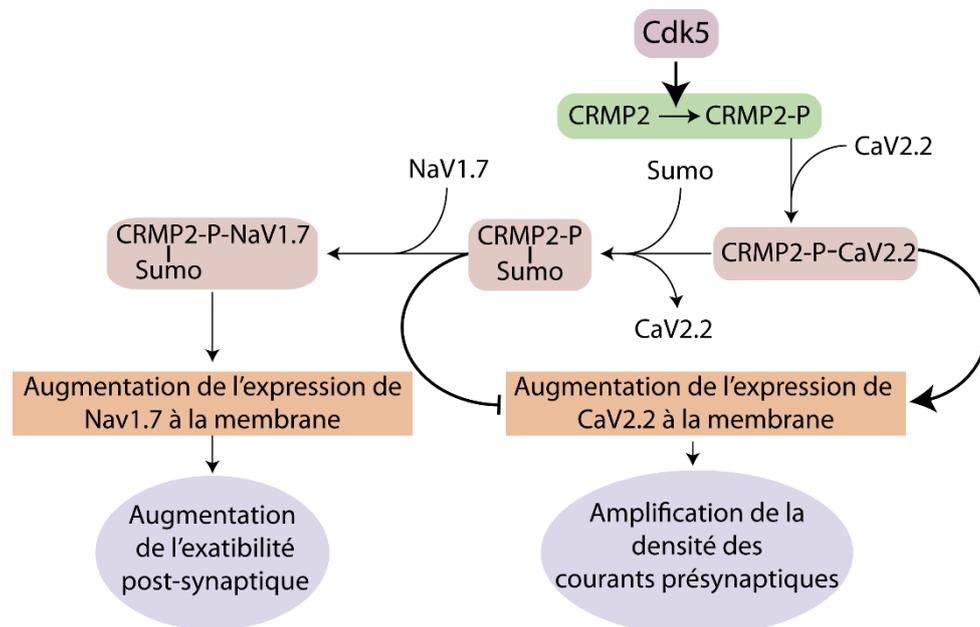


Figure 19 : Représentation schématique du rôle de CRMP2 dans la régulation des courants ioniques d'après Brittain et al. 2009, Chi et al. 2009, Dustrude et al. 2016 et François-Moutal et al. 2018

Les CRMP ont également été impliquées dans des mécanismes de réponse à des ischémies cérébrales. Ces phénomènes sont provoqués par une suractivation des récepteurs NMDA au glutamate, provoquant une excitotoxicité due à une entrée massive de calcium et conduisant, entre autres, à une augmentation de l'activité des calpaïnes. Comme il a été mentionné précédemment, toutes les isoformes de CRMP sont des substrats de ces enzymes. La surexpression d'une forme clivée de CRMP2 va permettre de réduire l'expression de surface de la sous-unité NR2B des récepteurs NMDA, participant ainsi à la capacité des neurones à acquérir une résistance à la toxicité du glutamate après une exposition à ce neurotransmetteur (Bretin et al., 2006; Kowara et al., 2005). Une autre équipe a montré qu'à l'inverse, la protéolyse de CRMP2 par la calpaïne contribue au phénomène de dégénération et de mort cellulaire induite par une suractivation des récepteurs NMDA (Zhang et al., 2007). De plus, l'utilisation du peptide correspondant aux domaines de liaison de CRMP2 aux canaux calciques (CBD) bloque le clivage par la calpaïne de la CRMP2 endogène et favorise la survie neuronale suite à une stimulation excitotoxique. Ce peptide induit l'internalisation de la sous-unité NR2B dans les

épines dendritiques et réduit l'afflux de calcium causée par l'activation des récepteurs NMDA. Les auteurs suggèrent cependant qu'il n'y aurait pas forcément de lien direct dans leur système entre l'absence de clivage de CRMP2 et la neuroprotection (Brittain et al., 2011). Récemment, il a été montré que CRMP2 pouvait également interagir avec le domaine extracellulaire des récepteurs NMDA et jouer le rôle de neurotransmetteur atypique en induisant un influx de calcium. Cependant l'origine de la sécrétion de CRMP2 dans le milieu extracellulaire reste à démontrer (Castillo et al., 2018; Moutal & Khanna, 2018).

Outre les récepteurs NMDA, CRMP2 serait capable d'interagir avec l'échangeur de sodium/calcium (échangeur $\text{Na}^+/\text{Ca}^{2+}$) qui régule le calcium intracytosolique, et de supprimer son activité via son internalisation. Ces résultats suggèrent que CRMP2 jouerait un double rôle dans l'atténuation de la dysrégulation du calcium induite par le glutamate en modulant l'expression à la fois des récepteurs NMDA et de l'échangeur $\text{Na}^+/\text{Ca}^{2+}$ (Brustovetsky et al., 2014).

IV. 4. 2. 8. Les CRMP et le transport axonal

La mise en place de la polarité dans les cellules neuronales, est dépendante de mécanismes de transport qui vont permettre l'acheminement, à partir du corps cellulaire et via les microtubules, de matériel nécessaire au développement des dendrites, de l'axone et du cône de croissance. CRMP2 régule le transport antérograde des dimères de tubuline et du complexe Sra-1/WAVE1 qui agit sur le cytosquelette d'actine, en interagissant avec les chaînes légères de la kinésine 1 (Kawano et al., 2005; Kimura et al., 2005). CRMP2 qui est capable de se lier à la dynéine, bloque l'activité de cette dernière et pourrait permettre son transport antérograde jusqu'au cône de croissance. L'interaction de CRMP2 avec ces deux moteurs moléculaires se fait via des régions différentes de la protéine, les séquences correspondant aux acides aminés 110 à 150 et 348 à 440 semblent être nécessaires à sa liaison avec la dynéine alors que les résidus 440 à 572 sont requis pour la kinésine (Figure 14) (Arimura et al., 2009). L'interaction kinésine 1/CRMP2 est médiée par la phosphorylation de celle-ci sur la thréonine 555 et une dérégulation de ce mécanisme a été impliqué dans les altérations du transport observables dans la maladie d'Alzheimer (Mokhtar et al., 2018). CRMP2 est également capable de se lier, via son extrémité C-terminale, au moteur moléculaire Kif3 (Kinesin Family Member 3), qui va permettre son transport au niveau des « bundles » actines pour les stabiliser. Cette interaction est nécessaire

pour réguler la morphologie des prolongements neuronaux, l'absence de CRMP2 ou Kif3 conduisant à des phénotypes similaires d'hyper-branchement des neurites (Yoshihara et al., 2021). Récemment une étude a montré que les CRMP jouaient un rôle essentiel dans l'adressage des mitochondries au niveau de l'axone en stabilisant les microtubules sous forme de fuseau permettant de servir de « rails » aux kinésines nécessaires au transport (Chen et al., 2021).

IV. 4. 2. 9. Les CRMP dans différentes pathologies cérébrales

Les CRMP ont été impliquées de manière plus ou moins directe dans différentes pathologies neurologiques, psychiatriques mais aussi neurodégénératives.

Schizophrénie

La schizophrénie est considérée comme un trouble neurodéveloppemental caractérisé par un élargissement des ventricules et une diminution du volume du cortex frontal et de l'hippocampe, avec une réduction de la taille du soma neuronal, un raccourcissement de la longueur des axones et des dendrites et une perte des épines dans le cortex préfrontal et l'hippocampe (Hall et al., 2015). CRMP1 a été retenue comme un marqueur de la schizophrénie après avoir été retrouvée, en quantité plus importante sous forme insoluble, dans des extraits de cerveaux de patients schizophrènes. Plusieurs études protéomiques ont identifié également des changements significatifs des niveaux de CRMP2 dans le cerveau des patients atteints de schizophrénie (Beasley et al., 2006; Clark et al., 2006; Martins-De-Souza et al., 2010; Pennington et al., 2008). La réduction de la transcription et de la traduction régulée par mTOR de certaines isoformes de CRMP2 serait un facteur de risque impliqué dans cette pathologie (Pham et al., 2016). En outre, deux Single-Nucleotide Polymorphisme du CRMP2 humain ont été associés à une susceptibilité accrue de développer la maladie (Lee et al., 2015). La régulation de l'expression de CRMP4 par miR-132, un microARN non-codant essentiel au neurodéveloppement et aux processus neuronaux adultes, est altérée dans les tissus de sujets schizophrènes (Hill et al., 2014; Miller et al., 2012). La protéine DISC1 (Disrupted in schizophrenia 1), impliquée dans plusieurs maladies psychiatriques dont la schizophrénie, régule, elle l'expression de CRMP1 et CRMP2. Les auteurs montrent que l'absence de DISC1 induit l'augmentation de la production de CRMP2 et mettent en relation ce phénomène avec l'altération de la croissance axonale constatée dans des neuroblastomes privés de DISC1 (Ramos et al., 2019). Il a également été

montré que l'absence d'une enzyme GLO1 (Glyoxalase1) qui permet de lutter contre le stress oxydatif (ou stress carbonylé) dans des cellules IPSC (Induced pluripotent stem cells) provenant de patients atteints de schizophrénie, induisait la formation de CRMP2 hyper-carboxylée. Cette hypercarboxylation induit la conformation de dimère ou de trimère de manière irréversible et perturbe le rôle de CRMP2 dans l'assemblage des microtubules et la formation de « bundles » d'actine. Ces résultats présentent une piste de recherche intéressante pour la compréhension des phénomènes induisant la pathogénèse de la schizophrénie (Toyoshima et al., 2019). Récemment la même équipe a montré dans un modèle de souris Kif^{+/−} pour l'étude de la schizophrénie, que l'altération de la morphologie des neurones hippocampaux issus de cette souris étaient la conséquence d'une perturbation du transport de CRMP2 au niveau des bundles d'actine qui conduisait à l'apparition d'un branchement anormal. Les auteurs montrent en parallèle que l'utilisation de bétaïne (un métabolite anti-stress carbonique) favorise la décarboxylation de CRMP4 et le « bundling » de l'actine ce qui permet de compenser les effets induits par la perturbation de l'expression de Kif chez ces souris (Yoshihara et al., 2021).

Autisme

Récemment, un variant *de novo* de CRMP4 (S541Y) a été identifié chez un patient atteint de troubles du spectre de l'autisme (TSA). L'expression de l'homologue de ce gène muté chez la souris dans des cultures de neurones hippocampaux a conduit à une diminution du branchement des dendrites, indiquant que cette mutation modifiait le fonctionnement normal de la protéine (Tsutiya et al., 2017). Les souris CRMP4 KO présentent une hyperactivité des neurones du bulbe olfactif associée à une altération de la perception des odeurs. Ces résultats ont été mis en relation avec le fait que de nombreuses personnes atteintes de TSA ont des difficultés à traiter les informations sensorielles, ce qui souvent se manifeste par une hypersensibilité ou une hyposensibilité aux stimuli sensoriels (Tsutiya et al., 2016). La souris CRMP4 KO a été proposée comme modèle d'étude de certains phénotypes associés à l'autisme chez l'homme (Ohtani-Kaneko, 2019).

Maladie d'Alzheimer

Le cerveau de patients atteint de la maladie d'Alzheimer se caractérise par un dépôt d'amyloïdes, la formation de plaques séniles et d'enchevêtrements neurofibrillaires, une hyperphosphorylation des protéines associées aux microtubules dont Tau, et la dégénérescence de populations neuronales spécifique (Wang et al., 2013). Dès 1998, CRMP2 a été décrite

comme associée à ces enchevêtrements neurofibrillaires dans la maladie d'Alzheimer (Yoshida et al., 1998). Par la suite, une augmentation anormale de la proportion de CRMP2 phosphorylée aux niveaux des résidus thréonine 509, thréonine 514, sérine 518 et sérine 522 a été mise en évidence chez les malades et dans les modèles de rongeurs de la pathologie. L'expression de CRMP2 non phosphorylée n'était pas altérée de même que la phosphorylation de CRMP4 dans le cerveau de patients atteints de cette maladie (Cole et al., 2007; Xing et al., 2016). Une augmentation de l'activité de ROCK, induite par l'amyloïde-béta (A β) et qui à son tour phosphoryle CRMP2 également été constatée (Petratos et al., 2008). L'hyperphosphorylation de CRMP2 via ROCK, Cdk5 et GSK3 β induit le blocage de sa capacité à se lier aux microtubules et pourrait ainsi expliquer les anomalies morphologiques affectant les neurites et provoquées par l'accumulation d'A β . L'hyperphosphorylation de CRMP2 sur la thréonine 555 perturberait également sa liaison avec la kinésine 1, entraînant des altérations du transport axonal antérograde dans des modèles murins de la maladie d'Alzheimer (Mokhtar et al., 2018). La suppression du site de phosphorylation Cdk5, la sérine 522, de CRMP2 restaure les déficiences de la LTP et empêche l'apparition de défauts cognitifs et de mémoires induits par les oligomères d'A β (Isono et al., 2013). De plus, le blocage de l'interaction entre les récepteurs NMDA et CRMP2, par l'utilisation d'un peptide dérivé du domaine CBD de CRMP2 R9-CBD3, a montré des effets protecteurs contre la neurotoxicité induite par l'A β dans des cellules de neuroblastomes via l'inhibition de la phosphorylation de CRMP2 et de la voie de signalisation pCRMP2/NMDAR2B (Ji et al., 2019). Cette hyperphosphorylation de CRMP2 ne semble pas être un trait commun partagé par plusieurs pathologies neurodégénératives mais bien une caractéristique propre à la maladie d'Alzheimer (Williamson et al., 2011). Différentes drogues passant la barrière hématoencéphalique comme la naringénine ou le curcuma, de même que l'utilisation du peptide R9-CBD3 ont montré leur pouvoir inhibiteur sur la phosphorylation de CRMP2 et semblent être des pistes de recherche pour le traitement de cette maladie (Ji et al., 2019; Lawal et al., 2018; Wang et al., 2013).

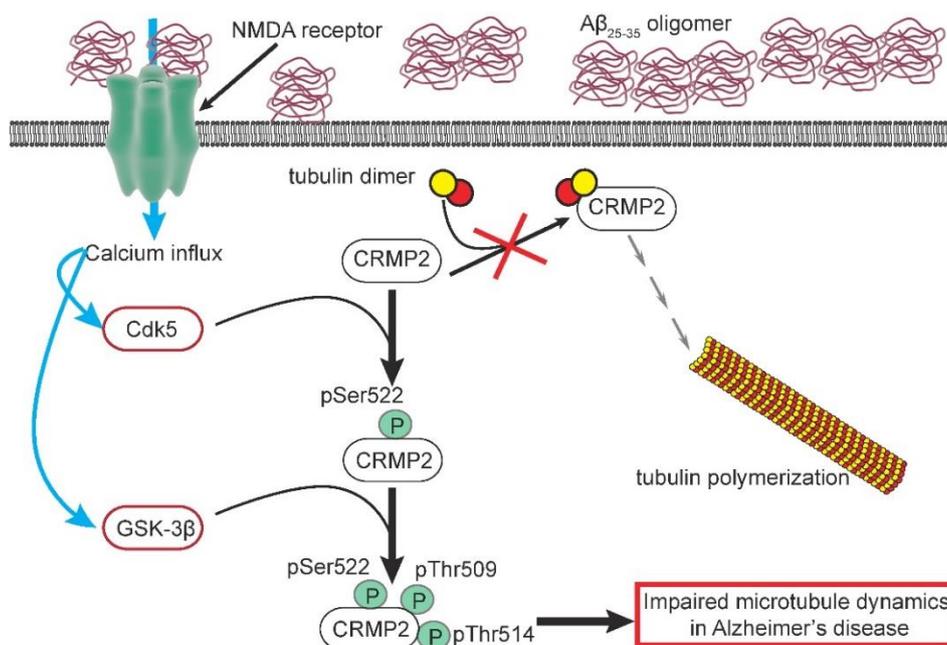


Figure 20 : Représentation schématique du rôle joué par CRMP2 dans la maladie d'Alzheimer d'après Quach et al., 2020

V. Radeaux lipidiques

V. 1. Les membranes lipidiques : le concept de mosaïque fluide et l'existence de microdomaines

Le concept de mosaïque fluide proposé par Singer et Nicolson en 1972 pour caractériser la membrane cytoplasmique repose sur un modèle selon lequel « les protéines, qui font partie intégrante de la membrane, sont un ensemble hétérogène de « molécules globulaires », chacune disposée dans une structure amphipathique, c'est-à-dire avec les groupes ioniques et hautement polaires faisant saillie de la membrane dans la phase aqueuse et les groupes non polaires largement enfouis à l'intérieur hydrophobe de la membrane. Ces molécules globulaires sont partiellement noyées dans une matrice de phospholipides. La majeure partie des phospholipides est organisée en une bicouche fluide discontinue, bien qu'une petite fraction des lipides puisse interagir spécifiquement avec les protéines membranaires » (Singer & Nicolson, 1972). Cependant, des études plus récentes ont conduit à nuancer ce modèle et à considérer les lipides au sein de cette bicouche non plus seulement comme un solvant pour les protéines membranaires mais comme pouvant s'organiser en domaines distincts et servir de plateformes de recrutement pour des protéines impliquées dans des événements cellulaires précis, favorisant

ainsi une efficacité et une spécificité de réponse. Il existerait différents types de domaines caractérisés par la présence de protéines dominantes comme par exemple la clatherine pour les puits de clatherine, ou encore par une composition en espèces lipidiques particulières. En 1997, Simons et Ikonen suggèrent que l'agrégation dynamique des sphingolipides et du cholestérol induirait la formation de « radeaux » stables qui se déplaceraient à l'intérieur de la bicouche fluide (Simons & Ikonen, 1997).

V. 2. Les radeaux lipidiques : définition et évolution du concept

V. 2. 1 Composition des radeaux lipidiques

V. 2. 1. 1. Les sphingolipides

Les sphingolipides sont des dérivés du céramide, un lipide impliqué dans de nombreux mécanismes cellulaires. Les céramides sont synthétisées en sphingolipides au niveau du réticulum endoplasmique et peuvent ensuite être transportés vers le Golgi pour devenir des gangliosides (en particulier, GM1 et GM3). Les GM (ganglioside mono acide sialique), sont des glycolipides complexes avec de fortes propriétés amphiphiles en raison de leur tête saccharidique et d'une entité hydrophobe à double queue (le céramide) (Sonnino et al., 2007).

V. 2. 1. 2. Le cholestérol

Le cholestérol, autre composant membranaire majeur des radeaux lipidiques, est synthétisé au dans le réticulum endoplasmique et est ensuite acheminé vers le Golgi où il se lie aux sphingolipides ou à des protéines (Samsonov et al., 2001). Ces structures enrichies en sphingolipides et en cholestérol s'agrègent dans le Golgi et génèrent des vésicules qui sont transportées vers la membrane plasmique pour former les radeaux.

V. 2. 1. 3. Les protéines à l'intérieur des radeaux lipidiques

Le réseau golgien assure également le rôle de station de tri et d'adressage majeure pour les protéines nouvellement synthétisées. Les protéines liées aux radeaux peuvent être de deux types, intrinsèque ou périphérique. Les protéines « intrinsèques » sont situées à l'intérieur de la

bicouche grâce à un segment hydrophobe. C'est le cas de protéines palmitoylées et myristoylées comme les flotilines, les kinases Src, et les cavéolines liant le cholestérol (Anderson, 1998; Head et al., 2014; Kwiatkowska et al., 2020; Solis et al., 2007). Les protéines dites « périphériques » ne sont, elles, pas localisées directement à l'intérieur de la bicouche lipidique mais reliées à la membrane par des interactions avec des protéines intrinsèques ou par des interactions avec les têtes polaires des lipides. Les radeaux sont particulièrement enrichis en protéines qui s'ancrent à la membrane au niveau de la face exoplasmique via une ancre GPI (glycosylphosphatidylinositol). Il a été montré que les protéines à ancre GPI étaient exprimées en majorité au pôle apical de plusieurs lignées de cellules épithéliales polarisées (Lisanti et al., 1988) et que ces protéines étaient vraisemblablement adressées à la membrane plasmique de manière couplée avec des groupes de sphingolipides et des microdomaines riches en cholestérol (van Meer & Simons, 1988). Ces associations protéines-lipides se font au niveau du Golgi et sont résistantes à l'utilisation de détergents (D. A. Brown & Rose, 1992). D'autre part, il a été montré que le transport apical dans les cellules épithéliales est très sensible à l'appauvrissement en cholestérol ou blocage de la synthèse de sphingolipides (Hansen et al., 2000). Ces différents points ont contribué à la fois à l'émergence du concept des radeaux lipidiques et à la mise en évidence de leur implication dans le transport et l'adressage de protéines spécifiques à la membrane (Surma et al., 2012).

V. 2. 2. Vers une définition plus précise des radeaux lipidiques

Ce nouveau concept de radeaux lipidiques eu beaucoup de succès et entraîna la publication de nombreux papiers dans les années qui suivirent, la majorité des protéines membranaires étant décrite comme associées à ces radeaux, conduisant à l'idée que la membrane plasmique serait un radeau géant, ponctué çà et là par de petits domaines de caractère non-radeau (Goñi, 2019). Cet engouement rendit nécessaire l'établissement d'une définition plus fine et plus restrictive de ce qui pouvait être considéré comme radeau lipidique à proprement parler et certains aspects du modèle de Singer et Nicolson ont été discutés. En effet, initialement le principe de formation des radeaux était basé sur l'interaction lipides-lipides et supposait que les protéines venaient ensuite s'insérer dans un environnement lipidique déjà existant. Ce modèle a quelques peu évolué pour tenir compte des interactions lipides-protéines et protéines-protéines dans la formation des radeaux lipidiques. Certains lipides spécifiques s'associeraient avec les protéines adressées aux microdomaines membranaires formant autour de celles-ci une

enveloppe lipidique et leur permettant ensuite de se regrouper entre elles pour former ces radeaux (Anderson & Jacobson, 2002). A partir de 2006, la taille de ces rafts - notion qui n'avait pas été abordée par la première définition de 1997 - est discutée. Il est considéré désormais que les rafts font entre 10 et 200 nm même s'il est possible que de petits rafts puissent parfois être stabilisés et interagir entre eux pour former de plus grandes plateformes (Pike, 2006). Actuellement, les radeaux membranaires sont définis le plus souvent comme des « assemblages dynamiques de stérols à l'échelle nanométrique, enrichis en sphingolipides et en protéines spécifiques, dans lesquels l'état de repos métastable peut être modifié par l'intervention d'interactions lipides – lipides, protéines – lipides et protéines spécifiques – protéines spécifiques » (Simons & Sampaio, 2011). Mais là encore, même si cette définition se veut plus précise que celles qui avaient été proposées précédemment, elle est toujours sujette à débat et très dépendante de l'angle sous lequel les chercheurs se placent pour caractériser ces radeaux. En effet si les « biocellularistes » sont plus concentrés sur leur rôle et leur fonction dans les voies biologiques, les biophysiciens eux s'intéressent davantage à la composition exacte et la simulation mathématique du comportement de ces domaines, entraînant parfois des divergences de point de vue quant à ce qu'il est possible de considérer comme des radeaux lipidiques (Goñi, 2019; Levental et al., 2020).

V. 2. 3. Les cavéoles, des radeaux lipidiques particuliers

Il existe des structures membranaires apparentées aux radeaux lipidiques appelées cavéoles du fait de la présence de la protéine cavéoline à l'intérieur de ces domaines. La plupart des chercheurs se sont accordés sur le fait que les cavéoles avaient une constitution lipidique semblable à celle des radeaux : elles sont riches en sphingolipides ainsi qu'en cholestérol, résistent aux détergents et sont retrouvées dans les fractions de faibles densités à l'intérieur des gradients de sucrose (Anderson, 1998; Fielding & Fielding, n.d.). Pike, en 2004 a proposé que les cavéoles soient considérées comme un sous-ensemble de radeaux et cette classification est encore acceptée aujourd'hui (Pike, 2004). Une propriété importante des cavéoles, non partagée avec les autres radeaux, est qu'elles sont clairement visibles et leurs limites reconnaissables en microscopie électronique, l'outil qui a conduit à leur découverte. De plus à la différence des radeaux « classiques » très dynamiques, les cavéoles seraient des radeaux pré-vésiculaires très stables. De nombreux articles ont été consacrés à ces structures et à leur rôle essentiel dans l'endocytose et le transport vésiculaire. Dans la suite du développement de cette introduction

nous avons choisi de citer sans distinction les études faisant référence aux radeaux lipidiques en général et celles touchant spécifiquement aux cavéoles.

V. 3. Mise en évidence et isolement des microdomaines membranaires

V. 3. 1. Méthodes utilisant des détergents

La méthode communément utilisée pour isoler les radeaux lipidiques du reste de la membrane plasmique repose sur l'utilisation de détergent non ionique (Brown & London, 2000; Brown & Rose, 1992). Les radeaux lipidiques peuvent être caractérisés comme résistants à 1% de Triton X-100 à froid et situés dans la région à l'interface 5-30% du gradient de sucrose obtenu à partir de cellules ou de membranes isolées traitées avec ce détergent. Ces domaines riches en cholestérol et en sphingolipides se localisent en effet dans les fractions de basse densité alors que le matériel soluble, de densité plus grande, va être retrouvé au bas du gradient. D'autres détergents ont également été utilisés pour solubiliser les membranes comme le Brij 98, le lubrol WX, le Tween 20 et la composition lipidique des fractions membranaires résistantes à chacun d'entre eux était différente et ne correspondaient pas non plus à celle obtenue par l'utilisation du Triton X-100. Ces variations ont été interprétées comme étant dues aux différences de sélectivité de ces détergents pour certains lipides et ont conduit à l'hypothèse d'une coexistence possible de sous-types de radeaux lipidiques pouvant avoir des fonctions biologiques différentes (Pike, 2004). Cependant cette technique d'extraction des radeaux lipidiques demeure largement débattue (Munro, 2003). En effet pour certains, les régions membranaires isolées à l'aide de détergent sont seulement qualifiables de DRM (Detergent Resistant Membrane) mais il n'est pas possible d'affirmer avec certitude que ce sont des radeaux lipidiques. Outre le type de détergent choisi, la concentration à laquelle il sera utilisé et la quantité de matériel biologique de départ pour réaliser l'extraction vont énormément influencer sa capacité à solubiliser des domaines lipidiques particuliers. De plus, lors du processus de solubilisation par les détergents, des réarrangements non physiologiques sont susceptibles d'avoir lieu et il est possible que les DRM représentent en partie une agrégation de la membrane consécutive au traitement et à la lyse des cellules et qu'ils ne soient pas directement reliables aux radeaux natifs (Sot et al., 2002).

V. 3. 2. Méthodes utilisant la déplétion du cholestérol

Il est possible d'utiliser une approche différente de celle décrite précédemment mais complémentaire, qui consiste à réaliser la déplétion du cholestérol, un constituant majeur des radeaux lipidiques. Ces méthodes ne permettent pas d'isoler les radeaux mais peuvent servir néanmoins à confirmer l'association de protéines avec ces domaines particuliers et de déterminer l'implication de ces radeaux dans certains processus cellulaires. Il existe plusieurs types de molécules capables d'agir sur le cholestérol de différentes façons. La Filipine, par exemple va séquestrer le cholestérol, perturbant ainsi la dynamique des radeaux alors que la Méthyl- β -cyclodextrine va l'extraire des membranes (Gimpl & Gehrig-Burger, 2007, 2011; Keller & Simons, 1998). Les radeaux lipidiques étant des domaines particulièrement riches en cholestérol, ils vont être la cible première de ses molécules. Cependant, celles-ci peuvent s'attaquer à la membrane plasmique en générale, dont le cholestérol est aussi un constituant. Il convient donc d'essayer de maîtriser au mieux différents paramètres tels que le temps d'incubation ou encore la concentration du composé suivant le type cellulaire sur lequel il est testé, lors de l'utilisation de la Méthyl- β -cyclodextrine par exemple. Ces précautions sont nécessaires pour pouvoir ensuite affirmer que si des changements biologiques sont observés suite à son utilisation, ceux-ci sont bien dus à une altération spécifique des radeaux et non pas à des modifications touchant la membrane plasmique dans son ensemble (Gimpl & Gehrig-Burger, 2011)

V. 3. 3. Etude des radeaux lipidiques dans des membranes de cellules intactes

L'utilisation de détergents ou d'autres molécules comme celles citées précédemment pour l'étude des rafts possède l'inconvénient de pouvoir fortement perturber l'organisation naturelle des radeaux lipidiques voire de la membrane plasmique en général. Il peut donc s'avérer pertinent d'utiliser aussi des méthodes moins délétères et un peu plus directes pour étudier les radeaux lipidiques. Dès les premières publications sur les radeaux lipidiques, la difficulté à visualiser ces petites structures transitoires a été soulevée (Simons & Ikonen, 1997). Depuis lors, une dizaine d'approches expérimentales différentes ont été essayées pour la détection de radeaux et pour l'étude de l'organisation des membranes en général, comme par exemple la microscopie électronique, le FRAP (Fluorescence recovery after photobleaching), le FRET

(Fluorescence resonance energy transfert), le FLIM (Fluorescence lifetime imaging microscopy), le STP (single particle tracking) (van Zanten & Mayor, 2015). Il reste cependant encore des améliorations à apporter à ces techniques pour pouvoir atteindre la résolution spatiale et temporelle permettant la visualisation concluante de ses structures. Dans une revue récente les auteurs ont conclu que la détection directe de ces domaines insaisissables dans les membranes cellulaires, tout en restant difficile, peut être à portée de main (Sezgin et al., 2017). En effet, le développement de la microscopie à super-résolution a permis d'observer les radeaux lipidiques dans divers types de cellules, ce qui a contribué à l'acceptation plus large de ce concept (Hartley et al., 2015; Nozumi et al., 2017; Schlegel et al., 2019). En attendant la démocratisation de ces techniques, il est possible d'observer les radeaux lipidiques en microscopie à fluorescence via des expériences de pontage consistant à utiliser des anticorps dirigés contre des protéines présentes dans les radeaux, ce qui permet de regrouper ceux-ci en « clusters » de taille plus importante (Harder et al., 1998).

V. 4. Rôles des radeaux lipidiques dans différents mécanismes cellulaires

Comme il a été précisé plus tôt dans cette introduction, les radeaux lipidiques ont commencé à être étudiés à travers leur implication dans le transport et l'exocytose (voir partie « Les radeaux lipidiques : définition et évolution du concept ») et il existe aujourd'hui une très grande quantité d'articles traitant de leur rôle dans ces mécanismes cellulaires. De même, un nombre important de protéines prenant part à plusieurs cascades de signalisation permettant d'assurer des fonctions cellulaires essentielles ont été localisées au niveau des radeaux lipidiques. Il serait long, fastidieux et peu judicieux de recenser et de décrire ici tous les mécanismes cellulaires faisant intervenir ces domaines membranaires spécifiques. A ce titre, nous avons fait le choix de nous concentrer, la plupart du temps, sur des études réalisées dans des cellules du système nerveux. Certaines fonctions sont bien évidemment communes à tous les types cellulaires, cependant il existe des mécanismes spécifiques aux neurones et aux autres cellules du système nerveux dans lesquels les radeaux lipidiques jouent un rôle prépondérant et essentiel (Korade & Kenworthy, 2008; Tsui-Pierchala et al., 2002).

V. 4. 1. Radeaux lipidiques et trafic intracellulaire du Golgi à la membrane plasmique

La gaine de myéline synthétisée par les oligodendrocytes isole les axones du système nerveux central et est un sous-domaine spécialisé de la membrane plasmique, contenant une composition particulière de protéines et de lipides. Une étude a permis de montrer que l'adressage de protéines à ancre GPI au niveau de la gaine de myéline au cours de la maturation des oligodendrocytes, était régulée par des domaines riches en cholestérol et en sphingolipides résistants au détergent (Krämer et al., 1999).

Des résultats présentant l'existence d'un mécanisme similaire dans des neurones d'hippocampe ont été publiés par la suite (Um & Ko, 2017). La localisation axonale de la protéine Thy-1 dépend de son association avec des radeaux lipidiques et que ceux-ci pourraient donc permettre l'adressage dans les neurones de protéines au niveau de compartiments membranaires particuliers (Ledesma et al., 1998). Plus récemment, il a été montré que les radeaux lipidiques contribuent également au trafic des récepteurs aux neurotransmetteurs dans les neurones. Ces mécanismes seront développés plus en détail dans la partie consacrée au rôle de ces domaines lipidiques dans la transmission synaptique.

V. 4. 2. Radeaux lipidiques et transmission synaptique

Il a été montré que ces domaines membranaires sont particulièrement impliqués dans la transmission synaptique, c'est-à-dire le passage du message nerveux d'un neurone à l'autre. Ils interviennent dans ce mécanisme en tant que plateforme permettant de moduler la localisation et l'organisation des canaux ioniques et des récepteurs aux neurotransmetteurs ainsi que le relargage de ces neurotransmetteurs (Allen et al., 2007).

Les canaux potassiques voltages dépendant Kv1.4 responsables de la propagation du potentiel d'action le long de l'axone et du relargage de neurotransmetteur sont localisés, au niveau présynaptique, à l'intérieur de radeaux lipidiques. De même, les canaux Kv4.2 impliqués eux dans l'excitabilité de la membrane post-synaptique somatodendritique sont également retrouvés dans ces domaines spécifiques (Wong & Schlichter, 2004).

Plusieurs types de récepteurs ionotropes aux neurotransmetteurs sont répartis en groupe au niveau de la membrane plasmique. Cette distribution est nécessaire à la formation et au maintien des synapses et il a été montré que pour les récepteurs GABA A (acide γ -aminobutyrique), NMDA (N-méthyl-d-aspartate), et à l'acétylcholine, les radeaux lipidiques contribuaient à la fois à la taille et au nombre de ces groupes de récepteurs, indiquant le rôle important de ces domaines pour la transmission synaptique (Hering et al., 2003; D. Zhu et al., 2006). De même, les récepteurs NMDA situés dans les radeaux lipidiques seraient à l'origine de la neurotoxicité, tandis que les récepteurs NMDA à l'extérieur des radeaux lipidiques sont responsables du guidage du cône de croissance médiée par le glutamate (Claudio Frank et al., 2004). L'oligomérisation des sous-unités des récepteurs NMDA et à l'acétylcholine module leur affinité pour l'agoniste, et leur localisation au sein des radeaux pourrait avoir un rôle dans l'orientation et la disponibilité des récepteurs ionotropes pour la formation de multimères (Laube et al., 1998). Il a également été montré que la déplétion du cholestérol dans les membranes de neurones hippocampaux via l'utilisation de Méthyl- β -cyclodextrine bloquait la LTP (potentialisation à long terme), un mécanisme faisant mettre en jeu les récepteurs AMPA et NMDA et nécessaire au processus de mémorisation (Frank et al., 2008).

Les radeaux lipidiques pourraient aussi contribuer au trafic de récepteurs ionotropes vers et depuis la membrane cellulaire. Les cellules appauvries en radeaux ont moins de récepteurs à l'acétylcholine à leur surface cellulaire, probablement en raison d'un transport altéré du golgi à la membrane et / ou d'une stabilité membranaire réduite (Pediconi et al., 2004). De même, la destruction des radeaux lipidiques réduit la stabilité des récepteurs AMPA de surface, mais augmente également l'internalisation des récepteurs non stimulés (Hering et al., 2003). Il a été démontré que les récepteurs à l'acétylcholine internalisés se colocalisent avec la cavéoline, suggérant une voie d'internalisation médiée par les cavéoles, un type de radeaux particulier (Trinidad & Cohen, 2004).

Les radeaux lipidiques jouent également un rôle dans le fonctionnement des récepteurs métabotropiques couplés aux protéines G (GPCR). La signalisation par les GPCR est complexe, nécessitant un minimum de trois composants protéiques : un récepteur, une protéine G et un effecteur de signalisation. Les radeaux lipidiques peuvent influencer la localisation ainsi que l'internalisation et le trafic intracellulaire de ces composants, modifiant la signalisation GPCR. Des études indiquent que des complexes stables se forment entre de nombreux GPCR et protéines G, et entre les protéines G et les effecteurs. Ces résultats s'expliquent par l'existence de complexes de signalisation GPCR qui, contrairement à ce qui a été longtemps cru ne

diffusent pas toujours de manière aléatoire dans la bicouche lipidique mais sont limités dans leur mobilité latérale à l'intérieur la membrane plasmique et sont confinés dans des microdomaines membranaires (Neubig, 1994). L'endocytose des récepteurs à l'histamine se fait via les radeaux et la stimulation agoniste des récepteurs de l'adénosine A1 augmente le pool de récepteurs dans les radeaux lipidiques, ce qui facilite vraisemblablement leur internalisation médiée par ces radeaux (Ginés et al., 2001; Self et al., 2005).

Des études ont montré que les domaines enrichis en cholestérol pouvaient également être impliqués dans le relargage de neurotransmetteurs. Plusieurs des protéines régulatrices du complexe SNARE, impliqué dans la fusion des vésicules synaptiques (syntaxine 1A, syntaxine 3, SNAP-25 et VAMP) ont été localisés par des approches biochimiques dans des radeaux ou des domaines lipidiques de type radeau. La déplétion en cholestérol altère la libération de dopamine par les cellules PC12 (cellules neuro-endocriniennes), soutenant l'importance des lipides radeaux dans l'exocytose de neurotransmetteurs (Chamberlain et al., 2001).

V. 4. 3. Radeaux lipidiques et croissance/guidage axonal

V. 4. 3. 1. Survie et Régénération

Il existe dans la littérature différents points de vue, parfois contradictoires, quant au rôle des radeaux lipidiques, et de manière plus générale du cholestérol, dans les mécanismes liés à l'apoptose.

Akt, une protéine sérine / thréonine kinase qui joue un rôle important dans la survie cellulaire, est plus efficacement activé lorsqu'elle est située dans des radeaux lipidiques. La perturbation de ces domaines à l'aide de Méthyl- β -Cyclodextrine entraîne une altération de la phosphorylation d'Akt au niveau de la thréonine 308 et de la sérine 473 et conduit à une baisse de l'activité Akt (Gao et al., 2008). D'autres kinases comme celles de la famille des PKC (protein kinases C), impliquées dans la survie cellulaire utilisent elles aussi les radeaux lipidiques comme plateformes d'activation (George & Wu, 2012). GSK3 β (glycogène synthase kinase 3 bêta), associée à la mort cellulaire par apoptose a été retrouvée accumulée avec la protéine huntingtine mutante dans les radeaux lipidiques de neurones pré-symptomatiques d'un modèle murin de la maladie de Huntington. Cette localisation contribuerait à la neurodégénérescence observée dans la maladie de Huntington (Valencia et al., 2010).

Il a été également démontré que l'appauvrissement en cholestérol via l'utilisation de Méthyl- β -Cyclodextrine protège les neurones du cervelet de l'apoptose induite par la voie cAMP/PKA/CREB (Zhou et al., 2012). De plus, après une lésion au niveau du système nerveux central, la destruction des radeaux lipidiques favorise la survie des cellules en bloquant l'association de ces domaines avec la néogénine, un récepteur promouvant l'apoptose neuronale (Tassew et al., 2014). Une étude récente a également mis en évidence que le traitement de neurones hippocampaux avec des molécules altérant la composition des radeaux, et entre autres la Méthyl- β -Cyclodextrine, favorisait la régénération ainsi que la croissance axonale (Roselló-Busquets et al., 2019).

V. 4. 3. 2. Guidage et croissance axonale

Les radeaux lipidiques ont été décrits comme jouant un rôle dans les processus de guidage et de croissance axonale médiés par différents types de molécules de guidage. Une des particularités des éphrines est qu'elles sont liées à la membrane plasmique soit par une ancre GPI, les éphrines A, soit par un domaine transmembranaire pour les éphrines B. Ces deux classes de molécules de guidage médient des événements de signalisation qui ont lieu dans des radeaux lipidiques. L'éphrine A5, lorsqu'elle se lie à son récepteur induit une signalisation reverse compartimentée au niveau de radeaux lipidiques permettant la redistribution de protéines cytosquelettiques nécessaire pour l'adhésion cellulaire (Davy et al. 1999). De plus la rétraction médiée par l'éphrine A5 des axones des cellules ganglionnaires de la rétine implique une signalisation AMPc (adénosine monophosphate cyclique) dépendante limitée au niveau des radeaux lipidiques et est indépendante de la modulation de l'AMPc en dehors de ces microdomaines (Averaimo et al., 2016). Les radeaux lipidiques permettent ici de compartimenter l'utilisation d'une molécule impliquée dans de nombreux mécanismes à l'intérieur une cascade de signalisation bien précise. La liaison de l'éphrine B1 avec son récepteur induit, via sa queue C-terminale, le recrutement dans des radeaux de protéines adaptatrices de la famille GRIP (glutamate-receptor-interacting protein). Ces protéines GRIP vont à leur tour recruter au niveau de ces domaines membranaires une sérine / thréonine kinase nécessaire à leur phosphorylation, un événement permettant le déclencher une signalisation inverse, elle-même nécessaire à la migration cellulaire au cours de la mise en place du système nerveux (Brückner et al., 1999).

La nétrine-1 exerce un effet attractif sur les cônes de croissance des neurones commissuraux via l'interaction avec son récepteur DCC (Deleted in Colorectal Cancer) (Huber et al., 2003). Ce récepteur DCC est palmitoylé au niveau de son domaine transmembranaire, lui permettant d'être recruté dans les radeaux lipidiques lors de sa liaison avec la nétrine-1. Une mutation du site de palmitoylation du DCC altère en aval la cascade de signalisation activée par les MAPK (Mitogen-activated Protein Kinases) (Hérincs et al., 2005). De plus l'application de BDNF ou de Sema3A, ayant respectivement des effets attractifs et répulsifs sur les cônes de croissances de neurones de xénope, induit la relocalisation d'une partie des récepteurs TrkB au BDNF et des récepteurs neuropiline 1 à la Sema3A à l'intérieur des radeaux (Guirland et al., 2004). Les traitements pharmacologiques ciblant les lipides constituant les radeaux (cholestérol ou ganglioside GM1) bloquent l'activation induite par la nétrine-1, le BDNF et la Sema3A de la voie MAPK et la réorientation des cônes de croissance (Guirland et al., 2004).

Enfin, Akt, qui a été cité précédemment pour son rôle dans la mort neuronale apoptotique via sa localisation dans les radeaux, est impliqué aussi dans la croissance axonale. L'utilisation d'Akt constitutivement actif, localisée spécifiquement à l'intérieur des radeaux lipidiques du cône de croissance permet d'augmenter l'élongation des axones de manière plus importante que lorsque cette kinase est exprimée de manière plus ubiquitaire au sein du neurone (Grider et al., 2009).

V. 4. 3. 3. Adhérence cellulaire

La croissance des neurones dépend également de molécules d'adhérence cellulaire (CAM) et certaines d'entre elles ont été elles aussi localisées au niveau des rafts. La NCAM140 peut agir comme un récepteur neuronal qui stimule la croissance des neurites lors de la liaison homophile NCAM – NCAM. La NCAM140 est palmitoylée au niveau de son domaine cytoplasmique proche de la membrane plasmique, lui permettant d'être localisée à l'intérieur des radeaux lipidiques. La perturbation de cette association via la mutation de ces sites de palmitoylation diminue l'activation MAPK de la cascade de signalisation en aval et bloque la stimulation de la croissance axonale (Niethammer et al., 2002).

La L1 et la N-cadhérine, qui appartiennent elles aussi à la famille des CAM, sont situées dans les radeaux lipidiques. Elles sont impliquées dans la migration et la motilité du cône de croissance. L'utilisation de techniques particulières (microM scale chromophore-assisted laser inactivation (micro-CALI)) permettant la destruction localisée des radeaux a permis de montrer

que ces domaines sont impliqués dans le contrôle spatial de signaux dérivés de CAM dans les cônes de croissance (Nakai & Kamiguchi, 2002).

Tag1 est une protéine d'adhésion cellulaire possédant une ancre GPI lui permettant d'être localisée dans les domaines de la membrane cytoplasmique riches en gangliosides. La localisation de Tag 1 à l'intérieur des radeaux lipidiques est essentielle dans le guidage et la croissance neuritique des neurones du cervelet, via l'activation de la voie Lyn Kinase (Kamiguchi, 2006; Kasahara et al., 2000).

V. 4. 3. 4. Cytosquelette

Plusieurs études ont mis en évidence les liens étroits existants entre les radeaux lipidiques et le cytosquelette. Celui-ci serait en effet impliqué dans la formation et le maintien de ces domaines lipidiques. L'utilisation de drogues inhibant ou au contraire favorisant la formation d'actine F a permis de montrer que le regroupement de certaines protéines à l'intérieur des radeaux lipidiques est sensible à la polymérisation de l'actine (Chichili & Rodgers, 2007). De plus, l'extraction du cholestérol via l'utilisation de méthyl-bêta-cyclodextrine réduit les comètes d'actine, établissant l'hypothèse selon laquelle les radeaux favoriseraient la formation de ces comètes. Ce mécanisme serait médié par PIP 2, cofacteur de nombreuses protéines ancrant les filaments d'actine à la membrane plasmique et localisé à l'intérieur des radeaux, et par la signalisation la voie WASP-Arp2/3 (Chichili & Rodgers, 2007; Rozelle et al., 2000). Les études précédemment citées ont été réalisées dans des cellules du système immunitaire mais d'autres travaux mettent en évidence l'importance de la collaboration du cytosquelette et des radeaux lipidiques dans un contexte neuronal. La signalisation induite par le GDNF par exemple, est dépendante de ce mécanisme. Le GDNF (Glial cell-derived neurotrophic factor) agit par l'intermédiaire du récepteur tyrosine kinase Ret, qui joue un rôle important dans la différenciation cellulaire, la survie et la migration au cours du développement embryonnaire. Des études ont démontré qu'en réponse au GDNF, Ret se transloque vers des microdomaines membranaires riches en cholestérol et sphingolipides et que cette relocalisation est dépendante de la polymérisation de l'actine et du remodelage du cytosquelette (Li et al., 2017). D'autres signalisations font intervenir conjointement les radeaux lipidiques et les microtubules cette fois-ci. De nombreuses molécules impliquées dans l'adhésion et le développement des cellules neuronales contiennent des motifs de type immunoglobuline (Ig). Une équipe a montré qu'une IgM recombinante humaine était capable de promouvoir la croissance axonale de neurones

hippocampaux et corticaux en recrutant de la β -tubuline au niveau des radeaux lipidiques et en servant ainsi d'ancre pour la polymérisation des microtubules (Xu et al., 2011). Ce travail a permis de mettre en évidence l'importance du rôle joué par les radeaux lipidiques pour la dynamique des microtubules permettant l'élongation des axones.

Les études mentionnées dans deux des parties qui viennent de faire l'objet d'un développement (croissance et guidage axonal ; cytosquelette) s'accordent avec la vision selon laquelle les radeaux lipidiques jouent non seulement le rôle de plateforme permettant la colocalisation à la fois de récepteurs de plusieurs types de molécules de guidage et d'effecteurs intracellulaires impliqués dans différentes signalisations, mais sont également impliqués dans des mécanismes de régulation du cytosquelette. Ces différents éléments convergent vers l'idée que les radeaux lipidiques sont une composante essentielle des processus de guidage et de croissance axonale au cours du développement. Il nous a donc semblé judicieux de nous intéresser à l'implication potentielle des radeaux lipidiques dans notre sujet d'étude à savoir le rôle de CRMP4 dans la signalisation Sema3E.

V. 4. 3. 5. Radeaux lipidiques et protéines d'intérêt

Les protéines sur lesquelles nous travaillons ont, pour certaines, elles aussi été localisées à l'intérieur des radeaux lipidiques ou impliquées dans des mécanismes cellulaires essentiels dont l'intégrité était dépendante de ces domaines membranaires. L'utilisation de Métyl- β -cyclodextrine sur des neurones en culture exprimant CRMP4 induit la redistribution de celle-ci le long des neurites. De plus CRMP4 a été retrouvée dans des fractions correspondant aux radeaux après une extraction au Triton X100 et une centrifugation sur gradient de sucrose (Rosslénbroich et al., 2003).

Une autre étude a également montré que suite à une ischémie au niveau du cortex, la Nrp1 et des protéines de la famille des CRMP, dont CRMP4 étaient exprimées à l'intérieur des radeaux lipidiques, suggérant l'importance de ces domaines dans l'intervention conjointe de la NRP1 et des CRMP en réponse à ce type de lésion (Whitehead et al., 2010). Nous avons précédemment cité dans cette introduction les travaux de Guirland sur le rôle des radeaux lipidiques dans le guidage des neurones. Ils démontrent l'importance de l'intégrité de ces domaines membranaires, à l'intérieur desquels la Nrp1, est présente pour le guidage axonal en réponse à la Sema3A (Guirland et al., 2004). La PlxA1, qui joue le rôle de corécepteur avec la Nrp1, est

incorporée dans les radeaux lipidiques après une stimulation par la Sema3A (Moretti et al., 2008).

Pour ce qui est du VEGFR2, sa présence au niveau des cavéoles dans les cellules endothéliales a été démontrée, elle inhiberait sa phosphorylation et par conséquent son activation (Labrecque et al., 2003; Zabroski & Nugent, 2021).

Deux des trois protéines membranaires qui constituent le complexe récepteur de la Sema 3E des neurones du subiculum, ainsi que CRMP4, ont donc été retrouvées, indépendamment les unes des autres, à l'intérieur des radeaux lipidiques.

V. 5. Controverse

Il existe aujourd'hui dans la littérature de nombreuses publications, dans différents domaines faisant intervenir de la biologie cellulaire, qui reprennent ce terme de radeaux lipidiques peut être de manière galvaudée aux yeux de certains puristes. De plus même si depuis sa première formulation en 1997, la définition des radeaux lipidiques a été à la fois enrichie et précisée, elle est loin aujourd'hui de faire consensus, comme nous l'avons souligné précédemment. De la même manière, certaines méthodes expérimentales utilisées couramment pour visualiser ces radeaux, les extraire ou encore les détruire sont critiquées et ne font pas l'unanimité quant à leur efficacité, au sein de la communauté scientifique (Levental et al., 2020). Pour notre part, notre approche de ces domaines spécifiques s'intègre dans un travail plus large portant sur la compréhension d'une voie de signalisation, allant de la caractérisation du rôle des acteurs protéiques impliqués dans ce mécanisme à l'étude de l'établissement d'un tract axonal au niveau du cerveau. Nous avons choisi d'employer pour la suite du développement de cette thèse le terme de « domaines membranaires résistants au détergent » (DRM), puisque c'est la méthode que nous avons pris le parti d'utiliser pour isoler ces régions spécifiques du reste de la membrane plasmique. Les résultats obtenus au cours de nos différentes expériences sur ces domaines lipidiques particuliers seront évidemment critiqués dans la discussion et les limites des conclusions qu'il est possible d'en tirer seront mises en évidence.

VI. Résumé du projet

Caractérisation du rôle de CRMP4 dans la voie de signalisation sémaphorine3E et le développement du fornix

L'un des objectifs des neurosciences est d'élucider les mécanismes moléculaires impliqués dans la morphogenèse neuronale et conduisant à la mise en place de réseaux neuronaux. Au cours du développement embryonnaire, les neurones établissent entre eux des milliards de connexions via l'émission de dendrites et d'axones qui vont croître rapidement grâce au cône de croissance situé à leur extrémité. Cette croissance est finement régulée, par les molécules de guidage rencontrées par le cône de croissance, mais dépend également du type de récepteurs pour ces molécules et des effecteurs intracellulaires propres au neurone. Notre laboratoire s'est intéressé au fornix post-commissural, un tract composé d'un ensemble d'axones de neurones du subiculum, appartenant à la formation hippocampique, et qui projettent dans les corps mamillaires de l'hypothalamus. Le fornix post-commissural appartient au système limbique et est impliqué dans la mémoire, la gestion des émotions et la navigation. L'altération de l'intégrité de cette structure a été associée à des troubles psychiatriques ainsi qu'à des maladies neurodégénératives. Son développement est contrôlé par la sémaphorine 3E (Sema3E), une molécule de guidage exerçant un effet attractif sur les neurones du subiculum via un complexe de récepteurs constitué de la plexine D1 (PlxD1), de la neuropiline 1 (Nrp1) et du VEGFR2. La liaison de la Sema3E sur la PlxD1 et la transduction du signal via le VEGFR2 induit le recrutement de la voie PI3K/Akt/GSK3 β . Cependant les acteurs responsables, *in fine*, du remodelage du cytosquelette, essentiel pour permettre la croissance axonale, restaient à identifier. Les CRMP1, 2 et 4 ont été caractérisées au départ comme des acteurs de la signalisation sémaphorine 3A, dans laquelle elles régulent, entre autres, la croissance neuritique à travers leur capacité à agir sur le cytosquelette. Ces protéines peuvent en effet se lier avec l'actine et modulent également la dynamique des microtubules via leur déphosphorylation/phosphorylation par GSK3 β dont elles sont un substrat. Ces différents éléments tendaient à faire des CRMP des candidats intéressants dont l'implication potentielle dans la signalisation Sema3E méritait d'être étudiée. Parmi ces trois CRMP, seule l'absence de CRMP4 dans des neurones issus du subiculum en culture bloque leur capacité à voir leur croissance axonale stimulée en présence de Sema3E. De plus l'analyse de la neuroanatomie d'embryons de souris CRMP4 révèle que ces animaux présentent à la naissance un développement anormal du fornix post-commissural et qui perdure à l'âge adulte. Une altération similaire de ce tract est présente chez des souris double hétérozygote

CRMP4/Sema3E, montrant une interaction entre ces deux gènes et entérinant le lien entre CRMP4 et Sema3E *in vivo*. De manière surprenante, CRMP4 interagit avec le complexe de récepteurs de PlxD1/Nrp1/VEGFR2 seulement à l'intérieur de microdomaines membranaires ayant une composition lipidique particulière et déjà caractérisés dans des mécanismes de guidage, les DRM (detergent resistant membrane). L'ajout de Sema3E sur des neurones du subiculum en culture a permis de mettre en évidence l'inhibition de la phosphorylation de CRMP4, en aval de la voie Akt/GSK3 β . De plus nous avons montré que l'intégrité des DRM de même que le domaine de liaison de CRMP4 au cytosquelette étaient nécessaires à l'activité stimulatrice de croissance de la Sema3E, suggérant un rôle pour CRMP4 à l'interface entre les récepteurs de la Sema3E membranaires et le cytosquelette. Ces différents résultats mettent en évidence le rôle essentiel de CRMP4 dans la signalisation Sema3E conduisant au développement du fornix et contribue à apporter une meilleure compréhension des mécanismes moléculaires impliqués dans l'établissement spécifique des connexions neuronales au cours de la mise en place en place du cerveau.

Characterization of the role of CRMP4 in the semaphorin3E signaling pathway and fornix development

One of the goals of neurosciences is to elucidate the molecular mechanisms involved in neuronal morphogenesis and leading to the establishment of neuronal networks. During embryonic development, neurons establish billions of connections between themselves via the emission of dendrites and axons that will grow rapidly through growth cones located at their tips. This growth is finely regulated by the guidance molecules encountered by the growth cone but also the type of receptors at the surface of the cell as well as the intracellular effectors that can be specific to certain types of neurons. Our laboratory was interested in the post-commissural fornix, a tract composed of a set of axons from neurons located in the subiculum, belonging to the hippocampal formation, that project into the mammillary bodies of the hypothalamus. The post-commissural fornix belongs to the limbic system and is involved in memory, emotion management and navigation. Alteration of the integrity of this structure has been associated with psychiatric disorders and neurodegenerative diseases. The development of the post-commissural fornix is under the control of semaphorin 3E (Sema3E), a guidance molecule exerting an attractive effect on subiculum neurons via a receptor complex consisting of plexin D1 (PlxD1), neuropilin 1 (Nrp1) and VEGFR2. Sema3E binding to PlxD1 and signal

transduction via VEGFR2 induces the recruitment of the PI3K/Akt/GSK3 β pathway. However, the actors responsible, in fine, for the remodeling of the cytoskeleton, essential for axonal growth, remain to be identified. CRMP1, 2 and 4 were initially characterized as actors of semaphorin 3A signaling, in which they regulate, among other things, neurite growth through their ability to act on the cytoskeleton. These proteins have the ability to bind with actin and modulate microtubule dynamics via their dephosphorylation/phosphorylation by GSK3 β of which they are a substrate. These different elements make the CRMPs potential candidates for Sema3E signaling. Among these three CRMPs, only the absence of CRMP4 in neurons from the subiculum in culture blocks axonal growth in the presence of Sema3E. Furthermore, neuroanatomical analysis of CRMP4 mouse embryos reveals that these animals show abnormal development of the post-commissural fornix at birth, which persists into adulthood. A similar alteration of this tract is present in CRMP4/Sema3E double heterozygous mice, suggesting an interaction between these two genes and confirming the link between CRMP4 and Sema3E in vivo. Surprisingly, CRMP4 interacts with the PlxD1/Nrp1/VEGFR2 receptor complex only within membrane microdomains with a particular lipid composition, the detergent resistant membrane (DRM), and has already been characterized in guiding mechanisms. The addition of Sema3E to cultured subiculum neurons allowed us to demonstrate the inhibition of CRMP4 phosphorylation, downstream of the Akt/GSK3 β pathway. Furthermore, we showed that the integrity of the DRMs as well as the cytoskeletal binding domain of CRMP4 was required for the growth-promoting activity of Sema3E, suggesting a role for CRMP4 at the interface between membrane Sema3E receptors and the cytoskeletal network. These different results highlight the essential role of CRMP4 in Sema3E signaling leading to fornix development and contribute to a better understanding of the molecular mechanisms involved in the specific establishment of neuronal connections during brain development

Résultats

Article 1

CRMP4 mediates fornix development through semaphorin-3E signaling pathway

Benoît Boulan, Charlotte Ravello, Amandine Peyrel, Christophe Bosc, Christian Delphin, Florence Appaix, Eric Denarier, Alexandra Kraut, Muriel Jaquier-Sarlin, Alyson E. Fournier, Annie Andrieux, Sylvie Gory-Fauré and Jean Christophe Deloulme

Article soumis au journal *Elife* le 22 juin 2021

Résumé de l'article

L'un des objectifs de la neurobiologie est d'élucider les mécanismes moléculaires à l'origine de la morphogenèse neuronale et conduisant à la mise en place de réseaux neuronaux organisés. Au cours du développement embryonnaire, les neurones établissent entre eux des milliards de connexions via l'émission de dendrites et d'axones qui vont croître rapidement grâce au cône de croissance situé à leur extrémité. Cette croissance n'est pas aléatoire mais finement régulée, le branchement inapproprié de ces neurones ayant de graves conséquences sur les fonctions sensorielles, motrices et cognitives du système nerveux et pouvant aboutir à des pathologies neurologiques et psychiatriques. La mise en place de connexions spécifiques est dépendante des molécules de guidage rencontrées par le cône de croissance, du type de récepteurs pour ces molécules exprimées à la surface du cône et des effecteurs intracellulaires propres au neurone. Notre laboratoire s'est intéressé au fornix post-commissural, un tract composé d'un ensemble d'axones de neurones du subiculum, appartenant à la formation hippocampique, et qui projettent principalement dans les corps mamillaires de l'hypothalamus. Le fornix post-commissural fait partie du système limbique et en particulier du circuit de Papez impliqué dans la mémoire, la gestion des émotions et de la personnalité ainsi que dans la navigation. L'altération de l'intégrité du fornix post-commissural a été associée à des troubles psychiatriques ainsi qu'à des maladies neurodégénératives. Le développement de cette structure est sous le contrôle de la sémaphorine 3E (Sema3E), une molécule de guidage, qui exerce un effet attractif sur les neurones du subiculum via un complexe de récepteurs constitué de la plexine D1 (PlxD1), de la neuropiline 1 (Nrp1) et du VEGFR2. La liaison de la Sema3E sur la PlxD1 et la transduction du signal via le VEGFR2 induit le recrutement de la voie PI3K/Akt/GSK3 β . Cependant les acteurs responsables, *in fine*, du remodelage du cytosquelette de microtubules et d'actine essentiel pour permettre la croissance axonale en réponse à la présence de la Sema3E, restaient à identifier. Les CRMP1, 2 et 4 ont été caractérisées au départ comme des acteurs de la signalisation sémaphorine 3A, dans laquelle elles régulent, entre autres, la croissance neuritique à travers leur capacité à agir sur le cytosquelette. En effet, elles possèdent la capacité de se lier avec l'actine et modulent la dynamique des microtubules via leur phosphorylation/déphosphorylation par GSK3 β dont elles sont un substrat. Ces différents éléments tendent à faire des CRMP des candidats intéressants dont l'implication potentielle dans la signalisation Sema3E méritait d'être étudiée. Cet article synthétise les résultats d'une étude commencée par Benoît Boulan et également la grande majorité de mon travail de thèse. Parmi ces trois CRMP, seule l'absence de CRMP4 dans des neurones issus du subiculum en

culture bloquait leur capacité à voir leur croissance axonale stimulée en présence de Sema3E. De plus, Benoit Boulan avait commencé une analyse de la neuroanatomique d'embryons de souris CRMP4 qui suggérait que ces animaux présentaient à la naissance un développement anormal du fornix post-commissural. J'ai pu observer que ce défaut perdurait à l'âge adulte, et qu'une altération similaire de ce tract était présente chez des souris double hétérozygotes CRMP4/Sema3E, confirmant le lien, *in vivo*, entre CRMP4 et cette molécule de guidage. J'ai pu ensuite identifier que CRMP4 interagissait avec le complexe de récepteurs de la Sema3E (la PlxD1, la Nrp1 et le VEGFR2) seulement à l'intérieur de microdomaines membranaires spécifiques appelés radeaux lipidiques et connus pour leur implication dans différentes signalisations dont celle de la Sema3A. L'ajout de Sema3E sur des neurones du subiculum en culture a permis de confirmer le recrutement de la voie PI3K/Akt/GSK3 β dans cette signalisation et a mis en évidence l'inhibition de la phosphorylation de CRMP4, en aval de GSK3 β . L'utilisation d'agent perturbant l'intégrité des radeaux lipidiques, a conduit au blocage de la signalisation Sema3E allant dans le sens d'un rôle de CRMP4 passant bien par les radeaux lipidiques. Sachant que la régulation de la phosphorylation de CRMP4 est cruciale pour son interaction avec les microtubules et que ceux-ci sont des acteurs indispensables de l'élongation axonale, j'ai regardé l'impact de l'utilisation de différents mutants de CRMP4 sur la croissance des axones en présence de Sema3E. Le mutant privé de ses domaines d'interaction avec le cytosquelette n'est plus capable d'induire l'élongation de l'axone en présence de Sema3E. Ces différents résultats mettent en évidence le rôle essentiel de CRMP4 dans la signalisation Sema3E conduisant au développement du fornix et contribuent à apporter une meilleure compréhension des mécanismes moléculaires impliqués dans l'établissement spécifique des connexions neuronales au cours de la mise en place en place du cerveau.

CRMP4-mediated fornix development involves semaphorin-3E signaling pathway

Benoît Boulan^{1,3*}, Charlotte Ravello^{1*}, Amandine Peyrel¹, Christophe Bosc¹, Christian Delphin¹, Florence Appaix¹, Eric Denarier¹, Alexandra Kraut¹, Muriel Jaquier-Sarlin¹, Alyson E. Fournier², Annie Andrieux¹, Sylvie Gory-Fauré^{1§} and Jean Christophe Deloulme^{1§}

¹ Univ. Grenoble Alpes, Inserm, U1216, CEA, Grenoble Institut Neurosciences, 38000 Grenoble, France

² Department of Neurology and Neurosurgery, Montréal Neurological Institute, McGill University, Montréal, Québec H3A 2B4, Canada

³ Present address: Cellular Neurobiology Research Unit, Institut de Recherches Cliniques de Montreal (IRCM), Montreal H2W 1R7, Canada

*These authors equally contributed to this study.

§These authors equally shared the supervision of this study.

Corresponding authors: Jean Christophe Deloulme (jean-christophe.deloulme@univ-grenoble-alpes.fr) and Sylvie Gory-Fauré (sylvie.gory-faure@univ-grenoble-alpes.fr)

ABSTRACT

Neurodevelopmental axonal pathfinding plays a central role in correct brain wiring and subsequent cognitive abilities. Within the growth cone, various intracellular effectors transduce axonal guidance signals by remodeling the cytoskeleton. Semaphorin-3E (Sema3E) is a guidance cue implicated in development of the fornix, a neuronal tract connecting the hippocampus to the hypothalamus. Microtubule-Associated Protein 6 (MAP6) has been shown to be involved in the Sema3E growth-promoting signaling pathway. In this study, we identified the Collapsin Response Mediator Protein 4 (CRMP4) as a MAP6 partner and a crucial effector in Sema3E growth-promoting activity. CRMP4-KO mice displayed abnormal fornix development reminiscent of that observed in Sema3E-KO mice. CRMP4 was shown to interact with the Sema3E tripartite receptor complex within Detergent-*Resistant* Membrane (DRM) domains, and DRM domain integrity was required to transduce Sema3E signaling through the Akt/GSK3 pathway. Finally, we showed that the cytoskeleton-binding domain of CRMP4 is required for Sema3E's growth-promoting activity, suggesting that CRMP4 plays a role at the interface between Sema3E receptors, located in DRM domains, and the cytoskeleton network. As the fornix is affected in many psychiatric diseases, such as schizophrenia, our results provide new insights to better understand the neurodevelopmental components of these diseases.

Keywords: Collapsin-Response-Mediator-Proteins, Semaphorin 3E, Detergent-Resistant-Membrane-Domains, fornix

INTRODUCTION

Axonal pathfinding and outgrowth are tightly regulated during central nervous system development, and allow neuronal tracts to be properly established. Axonal growth and guidance involve many signaling pathways triggered by various guidance cues such as semaphorins, netrins, and ephrins (Kolodkin & Tessier-Lavigne, 2011; Raper & Mason, 2017). These signals are transduced by transmembrane receptors to regulate intracellular effectors which then affect cytoskeleton dynamics, leading to axonal outgrowth modulation. Dysregulation of these signaling cascades results in neuronal connectivity defects, and sometimes cognitive or psychiatric disorders. In this study, we focused on the signaling pathway mediated by semaphorin-3E (Sema3E) and its role in the development of the post-commissural fornix. The post-commissure of the fornix is the major output of the hippocampus and is mainly composed of subicular axons that primarily terminate in the mammillary bodies (Witter, 2006). The post-commissural fornix belongs to a set of limbic connections, including the Papez circuit, involved in memory, emotion, personality, and navigation (Bubb, Kinnavane, & Aggleton, 2017). Disruption of the fornix is associated with several psychiatric disorders and neurodegenerative diseases (Koshiyama et al., 2020; Nowrangi & Rosenberg, 2015).

The attractive effect of Sema3E on subicular neurons is crucial for fornix development and is enabled by a tripartite receptor complex composed of plexin-D1 (PlxD1), neuropilin-1 (Nrp1) and vascular endothelial growth factor receptor-2 (VEGFR2) (Bellon et al., 2010; Chauvet et al., 2007). Some receptors involved in semaphorin signaling pathways, such as Nrp1, have been shown to localize to Detergent-Resistant Membrane (DRM) domains (including lipid rafts) (Guirland, Suzuki, Kojima, Lu, & Zheng, 2004). Cholesterol- and sphingolipid-enriched DRM domains are involved in axonal growth and guidance, acting as platforms for ligand-induced receptor activation and recruitment of intracellular actors (Simons & Sampaio, 2011). For example, kinases downstream of semaphorin signaling, such as Akt or glycogen synthase kinase-3 β (GSK3 β), can be recruited to DRM domains where they are activated (Gao & Zhang, 2009; Sui, Kovács, & Maggirwar, 2006). One of the major substrates of GSK3 β is the Collapsin Response Mediator Protein family (CRMPs) (Charrier et al., 2003; Hou, 2020). The five CRMPs members have been implicated in numerous neuronal processes including neurite outgrowth (Ji et al., 2014; Mohammad R Khazaei et al., 2014), dendritic arborization (Niisato et al., 2011, 2012), axonal regeneration (Alabed, Pool, Ong Tone, & Fournier, 2007; Alabed, Pool, Ong Tone, Sutherland, & Fournier, 2010; Leung et al., 2002), and axonal transport (Kimura, Watanabe, Iwamatsu, & Kaibuchi, 2005; Tsuboi, Hikita, Qadota, Amano, &

Kaibuchi, 2005). Within this family, CRMP2 was the first to be implicated in Sema3A-dependent growth-cone collapse in higher vertebrates (Goshima, Nakamura, Strittmatter, & Strittmatter, 1995) and continues to be the most extensively studied. Sema3A stimulates CRMP2 phosphorylation through GSK3 β activation which regulates the interaction between CRMP2 and the cytoskeleton (Fukata et al., 2002; Mohamad R Khazaei et al., 2014). Although repulsive Sema3A signaling has been well described in recent years, the molecules involved in Sema3E signaling and therefore in the growth of subicular neurons remain to be fully characterized. Recently, we showed that Microtubule-Associated Protein 6 (MAP6) was crucial for fornix development due to its role in regulating axonal elongation induced by Sema3E (Deloulme et al., 2015). Here, we found that although MAP6 interacts with CRMP1, 2 and 4, only CRMP4 is required for Sema3E axonal outgrowth. In mice, knockout of *Crmp4* is associated with defective development of the post-commissural fornix. The results presented here show that CRMP4 binds the tripartite Sema3E-receptor complex in a DRM domain-dependent manner. Disruption of DRM domains blocks Sema3E-mediated axonal growth and affects CRMP4 phosphorylation by GSK3 β . The integrity of DRM domains is thus critical for downstream activation of the PI3K/Akt/GSK3 β pathway by Sema3E. Furthermore, we found that Sema3E signaling triggers a reduction of GSK3 β -driven phosphorylation of CRMP4, and that the interaction of CRMP4 with the cytoskeleton is necessary to transduce Sema3E signaling.

Taken together, our results establish CRMP4 as a new specific downstream effector of the Sema3E signaling pathway, exerting its activity through DRM domains and phospho-regulated interactions with the cytoskeleton.

RESULTS

CRMP1, 2, and 4 are MAP6 partners

MAP6 protein is crucial for Sema3E-dependent fornix development (Deloulme et al., 2015). To identify new effectors of the Sema3E signaling pathway, we performed MAP6-immunoaffinity chromatography experiments coupled with mass spectrometry-based protein identification. Protein extracts from adult brains were passed over affinity columns containing monoclonal antibody directed against the neuron-specific MAP6-N isoform. Bound proteins were then eluted by addition of an excess of MAP6 peptide containing the epitope targeted by the monoclonal antibody. Eluted fractions were analyzed by mass spectrometry to identify MAP6 partners. Interestingly, proteins in the CRMP family, members of which are known to play critical roles during semaphorin signaling (Arbeille et al., 2015; Goshima et al., 1995; Niisato et al., 2011; Quintremil et al., 2016; Uchida et al., 2009; Yamashita et al., 2007), were identified as MAP6 partners. More precisely, we identified twelve specific peptides belonging to CRMP2, three specific peptides from CRMP4, two specific peptides from CRMP1, and six peptides shared by two or three of these CRMP proteins (Supplementary File 1). The presence and specificity of the CRMP-MAP6 complex was confirmed by co-immunoprecipitation experiments using wild type (WT) and MAP6-KO brain lysates (Figure 1A). To determine whether MAP6 interacts directly with CRMPs, we performed pull-down experiments using sepharose beads coupled to recombinant CRMPs (Figure 1 – Figure supplement 1). Purified MAP6-N bound directly to CRMP1, CRMP2 and CRMP4 (Figure 1B).

CRMP4 is crucial for Sema3E-dependent axonal outgrowth stimulation

To evaluate the function of MAP6-interacting CRMP isoforms in the axonal response to Sema3E, we used siRNAs to knockdown CRMP1, CRMP2, or CRMP4 (Figure 2A). All siRNAs were effective, with inhibition ranging from 40% to 80% (Figure 2A). We then analyzed the effect of each siRNA on basal axonal growth compared to a control siRNA (Figure 2B). Decreased expression of CRMP2 weakly stimulated axonal growth (108%, $p = 0.0275$), knockdown of CRMP1 showed the same tendency but the increase was not significant (106%, $p = 0.0976$). In contrast, axonal-growth stimulation was more pronounced following inhibition of CRMP4 expression (116%, $p = 0.0028$) (Figure 2B). These results show that downregulation of CRMPs stimulated basal axonal growth in cultured subicular neurons.

To analyze the specific effect of Sema3E, axonal lengths of Sema3E-treated neurons were normalized relative to their respective control conditions (Figure 2C and D). As previously reported (Chauvet et al., 2007; Deloulme et al., 2015), application of Sema3E (5 nM) to WT

cultured subicular neurons 48 h after electroporation with control siRNA, induced a 1.2-fold increase in axon length (Figure 2C and D, 120%, $p < 0.0001$). Although treatment with *Crmp1* or *Crmp2* siRNAs drastically reduced protein expression levels (Figure 2A), the Sema3E growth-promoting effect was still observed (Figure 2D, 119% and 124%, $p = 0.0013$ and $p < 0.0001$, respectively). Conversely, CRMP4 knockdown completely blocked the response to Sema3E (Figure 2C and D, 99%, $p > 0.9999$). These results show that among the three CRMPs isoforms interacting with MAP6, only CRMP4 is crucial for Sema3E's growth-promoting activity. The involvement of CRMP4 in the Sema3E signaling pathway was confirmed by experiments performed on neurons harvested from CRMP4-KO embryos. In accordance with the results from siRNA experiments (Figure 2B), CRMP4-KO neurons exhibited significantly longer axons (Figure 2E, 147%, $p > 0.0004$) and no longer responded to Sema3E stimulation (Figure 2F, 105%, $p = 0.2652$). Furthermore, electroporation of CRMP4-KO neurons with CRMP4-eGFP completely restored their response to Sema3E (Figure 2G, 143%, $p < 0.0001$). Altogether, these results show an inhibitory role for CRMP isoforms on basal axonal growth, and a specific mediation by CRMP4 of Sema3E-induced axonal outgrowth in cultured subicular neurons.

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

To assess whether CRMP4 can influence fornix formation through the Sema3E signaling pathway, we first determined the localization of CRMP4 during post-commissural fornix formation in the mouse brain. As reported in the rat brain (Byk, Ozon, & Sobel, 1998), CRMP4 was predominantly expressed during embryonic and postnatal development between embryonic day 17.5 (E17.5) and postnatal day 7 (P7), and levels declined sharply after postnatal day 14 (P14) (Figure 3-Figure supplement 1A).

We next investigated the pattern of *Crmp4* gene expression in the developing brain using a *LacZ* reporter gene inserted into the *Crmp4* locus of CRMP4-KO mice (Mohamad R Khazaei et al., 2014). *LacZ* expression was mainly detected within thalamic regions, habenular nuclei, hypothalamic regions, inside the hippocampus including CA1, CA2, CA3, subiculum, and to a lesser extent in cortical areas of E17.5 brain slices (Figure 3-Figure supplement 1B).

Consistent with the expression pattern observed for the *Crmp4* gene, CRMP4 immunostaining was localized in neuronal tracts such as the anterior commissure, which is mostly comprised of cortical projections, or fornix projections (fimbria-fornix (fi) and the post-commissural fornix (pf)) expressing *Nrp1*, the Sema3E co-receptor (Figure 3A column a). The post-commissural fornix is mainly composed of subicular neuron projections (Witter, 2006). At higher

magnifications, CRMP4 immunolabeling was detected both in the fimbria and the post-commissural fornix in Nrp1-positive tracts (Figure 3A columns c and d). This immunolabeling was specific since it was not observed on brain sections from CRMP4-KO mice (Figure 3A, columns b and e). In addition, cultured subicular neurons expressing the Nrp1 receptor also strongly expressed CRMP4 in the cell body, dendrites, axon, and growth cone (Figure 3B). Conventional confocal microscopy showed that CRMP4 and Nrp1 were strongly co-expressed, and co-localized in the growth cone in subicular neurons (Figure 3B, upper panels). Improved spatial resolution images of the growth cone were obtained using a confocal Airyscan detector (Zeiss) on two different acquisition planes. These images showed a close proximity between punctate Nrp1 and CRMP4 labelling positions (Figure 3B, lower panels). On both acquisition planes, the presence of yellow pixels suggests discrete co-localizations of the two proteins (Figure 3B, merge panels).

Taken together, our results indicate that during formation of the post-commissural fornix, CRMP4 is strongly expressed in subicular neurons and in their axonal projections *in vivo*.

CRMP4 is required for fornix integrity

We then analyzed whether deletion of the *Crmp4* gene affects post-commissural fornix formation *in vivo*. To do so, we immunolabeled the post-commissural fornix using antibodies directed against Nrp1 on WT and CRMP4-KO brain sections from P0 littermate pups. At this developmental stage, the projections forming the post-commissural fornix pass behind the anterior commissure, passing through the anterior hypothalamus and terminating at the posterior hypothalamus (Figure 4A, sagittal diagram). To view the post-commissural fornix, we used a number of histological approaches. Firstly, we prepared coronal sections at P0 and measured the diameter of the fornix at the level of the start of the anterior hypothalamic area (AHA) (Figure 4A, white arrowheads). We chose the AHA as an anatomical landmark due to its accuracy and its proximity to the post-commissural fornix, thus limiting bias due to differences in dorso-ventral positioning of brains during slicing. The diameter of the fornix was reduced by 53% in CRMP4-KO mice (Figure 4A, histograms, $p = 0.0043$). In contrast, the diameter of the neighboring mammillo-thalamic tract remained unchanged between WT and KO brains, indicating a specific role of CRMP4 in fornix formation (Figure 4A, histograms, $p = 0.7922$).

We then assessed the length of the entire post-commissural fornix and analyzed axon bundling patterns. To do so, we prepared sagittal slices with a cutting angle of 30° to visualize the entire post-commissural projection (Deloulme et al., 2015) (Figure 4B, coronal diagram). The length

of post-commissural fornices was measured using the anterior commissure as a starting point (Figure 4B, ac). The post-commissural fornix length was 26% shorter in CRMP4-KO brains (Figure 4B, histogram, $p = 0.0173$), appeared less fasciculated than in WT brains, and also presented divergent axons (Figure 4B, observed 3/6 KO, white arrow). Finally, to get a better quantitative estimation of the developmental defects affecting the post-commissural fornix in the absence of CRMP4, we used the tissue-clearing technique 3DISCO (Belle et al., 2014) after immunolabeling whole brain with Nrp1 antibodies. Brains were analyzed at three developmental stages: E18.5, P0, and P2. The post-commissural fornices were then manually segmented and 3D-reconstructed (Figure 4C, sagittal diagram and 3D reconstruction). The volume of post-commissural fornices in CRMP4-KO brains was smaller at all developmental stages than those in WT littermates' brains (Figure 4C). Furthermore, in CRMP4-KO brains, post-commissural fornices were less fasciculated, often containing some axon bundles deviating from the tract (Figure 4C white arrowheads, observed on 2/10 WT and 7/9 KO). Finally, quantification of the volume of the post-commissural fornix was significantly decreased – by 40% overall – in CRMP4-KO brains (Figure 4C, histogram, WT vs KO $p = 0.0070$), with a 51% reduction recorded at P0 (Figure 4C, histogram, $p = 0.0159$). Altogether, these results clearly show that deletion of *Crmp4* affects both embryonic and postnatal development of the post-commissural fornix.

We then assessed if the developmental defect observed in CRMP4-KO mice could have consequences on fornix integrity in adulthood. To analyze post-commissural fornix anatomy in adults, we performed myelin staining using gold chloride on coronal sections at three rostro-caudal planes (Figure 5B-D) selected based on morphologic landmarks (Figure 5A, see materials and methods section). In CRMP4-KO mice, the surface area occupied by the fibers in the post-commissural fornix progressively decreased in the rostro-caudal region, by 30%, 33%, and 47% (figure 5B, C, and D, $p = 0.0476$, $p = 0.0159$, $p = 0.0159$, respectively) compared to the corresponding WT post-commissural fornix. Calculation of the fasciculation index also revealed that the defect in the fornix was more significant in its terminal part in CRMP4-KO brains (Figure 5B, C, and D, -17%, -17%, -40%, $p = 0.111$, $p = 0.111$, $p = 0.0317$, respectively). As noted previously, no significant variation in mammillo-thalamic tract area was detected in adult brains, suggesting that the post-commissural fornix defect that appears during development persists into adulthood. Readers should note, the number of subicular neurons do not differ in adult WT- and CRMP4-KO brains (Figure 5 – figure supplement 1).

The fornix not only projects to the mammillary bodies through the post-commissural fornix (pf), but also projects into the septum (SPT) through the pre-commissural fornix, and into the anterior hypothalamus (AH) through the medial cortico-hypothalamic tract (mcht) (Figure 5A). Qualitative analysis of the pre-commissural fornix and mcht, using the hybrid-uDISCO clearing method (see material and method section) on brains expressing YFP across the fornix system, revealed no obvious difference in these tracts between WT and CRMP4-KO mice. Analysis of the fornix at the entry to mammillary bodies confirmed the loss of fibers in KO mice (Figure 5-figure supplement 2). These observations suggest that the post-commissural projection is the main fornix projection altered in CRMP4-KO.

Crmp4 gene shows a genetic interaction with Sema3e involved in post-commissural fornix development

The defect in fornix development combined with defasciculation observed in CRMP4-KO mice phenotypically copies the defects observed in Sema3E-KO mice (Chauvet et al., 2007).

To investigate genetic interactions between *Crmp4* and *Sema3e* during fornix development *in vivo*, we analyzed trans-heterozygous animals. The post-commissural fornix was segmented from the anterior commissure in whole brains cleared by iDISCO at P0 (Figure 6) (Renier et al., 2014). The fornix volume was 31% decreased in *Crmp4^{+/-}/Sema3e^{+/-}* double mutants compared to WT controls (Figure 6A and B, $p = 0.0061$). No significant decrease was observed in *Crmp4^{+/-}* or *Sema3e^{+/-}* single mutants (Figure 6B, -4% and + 2%, $p > 0.999$ for both). As a control, the mammillo-thalamic volume showed no variation (Figure 6C). The fornix defects found in single-gene knockout and in double heterozygous animals, but not in single heterozygous mice, are strong indicators of an *in vivo* interaction between *Crmp4* and *Sema3e* during fornix development.

CRMP4 interacts with the Sema3E receptor complex

Sema3E signaling is triggered by the tripartite complex comprised of PlxD1 (which binds Sema3E), its co-receptor Nrp1, and VEGFR2 which allows signal transduction leading to axonal growth (Bellon et al., 2010). Previous studies have shown that CRMPs can associate with Plexin A receptors to transduce class 3 semaphorin signaling (Deo et al., 2004; Jiang et al., 2020; Schmidt, Shim, & Strittmatter, 2008; Sekine, Algarate, Cafferty, Stephen, & Strittmatter, 2019). We therefore investigated a possible interaction between Sema3E receptors and CRMP4. To do so, ectopic PlxD1, Nrp1 and VEGFR2 were simultaneously expressed in HEK293T/17 cells in combination with CRMP4. We detected PlxD1, Nrp1, and CRMP4

proteins in VEGFR2 immunoprecipitates, indicating the presence of a complex involving both Sema3E receptor components and CRMP4 (Figure 7A).

Further experiments, ectopic PlxD1, Nrp1 and VEGFR2 were individually expressed in HEK293T/17 cells in combination with CRMP4-tGFP. VEGFR2 alone did not co-immunoprecipitate with CRMP4-tGFP (Figure 7B), whereas isolated Nrp1 or PlxD1 did (Figure 7C and D). These results strongly suggest that CRMP4 forms a complex with the Sema3E tripartite receptors through interactions with both PlxD1 and Nrp1.

CRMP4/Sema3E receptor complexes are located in Detergent-Resistant Membrane domains

The concentrations of salt (up to 500 mM NaCl) and detergent (0.5% Triton X-100) used in our immunoprecipitations were relatively high, thus the interactions between CRMP4 and Sema3E receptors were robust. Indeed, these interactions were even resistant to concentrations of up to 1% Triton X-100 (Figure 8A), suggesting a possible role of DRM domains in their formation. To test this possibility, HEK293T/17 cell lysate in 1% Triton X-100 buffer and expressing PlxD1, Nrp1 and CRMP4 were subjected to sucrose gradients allowing separation of cellular constituents based on their density (Figure 8B). Endogenous flotillin, a protein enriched in DRM domains was used as a marker of these structures to ensure successful fractionation of the membranes. Flotillin was mainly detected at the 5%-38% sucrose interface, in the fractions corresponding to the DRM (fractions 3, 4 and 5), as well as in the fractions consisting of the remaining plasma membrane (RPM, fractions 10, 11 and 12) (Figure 8B). CRMP4, Nrp1 and PlxD1 were also found in the DRM fractions (PlxD1: 7.7%, Nrp1: 4.3%, CRMP4: 1.6%, flotillin: 53.2%, n = 3) but in much lower amounts compared to the membrane fractions (PlxD1: 87.6%, Nrp1: 90.4%, CRMP4: 90.0%, flotillin: 32.4%, n = 3), suggesting that only a small proportion of the Sema3E receptors and CRMP4 locates in DRM (Figure 8B).

To confirm the presence of receptors and CRMP4 in DRM, HEK cells were treated with methyl-beta-cyclodextrin (M β CD), a cholesterol-depleting agent that can disrupt DRM (Ae, Gehrig-Burger, Gimpl, & Gehrig-Burger, 2007; Kilsdonk et al., 1995). Treating cell cultures with 10 mM M β CD for 7 h resulted in a complete elimination of CRMP4-containing and receptor-containing DRM, and partial reduction of flotillin-containing DRM (Figure 8C). This difference in efficacy between flotillin-containing and Sema3E receptor-containing DRM is expected, and may reflect heterogeneity across DRM domains (Foster, De Hoog, & Mann, 2003). To understand how CRMP4-Sema3E receptor complexes are distributed within DRM and membrane fractions, we analyzed co-immunoprecipitations of Sema3E receptors with CRMP4 in pooled DRM fractions (fractions 3, 4 and 5) or in pooled RPM fractions (fractions 10, 11 and

12) (Figure 8D). Surprisingly, even though the two receptors co-immunoprecipitated with CRMP4 in both RPM and DRM fractions, the ratio of receptors present in the IP relative to the amount of immunoprecipitated CRMP4 was considerably higher in the DRM fraction than in the RPM fraction (Nrp1 and PlxD1 signals represent 62% and 25% of CRMP4 signal, respectively in DRM fractions, as compared to 0.18% and 0.69% of CRMP4 signal, respectively in RPM fractions).

although Altogether these results strongly indicate that the complexes between CRMP4 and Sema3E receptors are mainly found within DRM domains in cells.

Detergent-Resistant Membrane domain integrity is required for the axonal growth-stimulating activity of Sema3E

DRM are dynamic membrane domains formed from the assembly of cholesterol, sphingolipids and proteins that can be stabilized and coalesce to function as a scaffold for cell signaling complexes (Lingwood & Simons, 2010). These domains are involved in the mediating signaling through several molecules controlling growth and axonal guidance (Averaimo et al., 2016; Davy et al., 1999; Guirland et al., 2004; Hérincs et al., 2005). To determine whether DRM domains are essential for Sema3E signaling, we treated subicular neurons with increasing doses of M β CD and assessed the effect of the resulting DRM disruption on Sema3E-induced outgrowth (Figure 9).

At first we first investigated the effect of M β CD on axonal growth, and found, in accordance with previous work (Ko et al., 2005), that the addition of 1 or 1.5 mM of M β CD had a very mild effect, resulting in a 1.1-fold increase in axonal length (Figure 9-figure supplement 1, 112% of control for 1 mM M β CD, and 115% for 1.5 mM). Next, Sema3E, in the absence of M β CD, induced an expected 1.3-fold increase in axonal length (Figure 9A and B, 137% of control, $p < 0.0001$), whereas in the presence of 1.0 mM and 1.5 mM M β CD, Sema3E no longer stimulated axonal growth (Figure 9A and B, 107% and 101% of control, $p = 0.1150$ and $p > 0.9999$ respectively). These results strongly suggest that DRM domain integrity is required for Sema3E signaling.

To further assess this possibility, we investigated the downstream signaling cascade induced by applying Sema3E to subicular neurons. Sema3E stimulates axon growth through activation of the PI3K/Akt/GSK3 β pathway (Bellon et al., 2010). By binding to PlxD1, Sema3E activates VEGFR2 which triggers the recruitment and activation of phosphatidylinositol 3-kinase (PI3K). Activated PI3K phosphorylates downstream Akt, which in turn phosphorylates glycogen

synthase kinase-3 β (GSK3 β) to inactivate it. CRMPs including CRMP4 are well-known substrates of GSK3 β , which catalyzes their phosphorylation on threonine 509 (Cole et al., 2006, 2004). We thus determined whether CRMP4 phosphorylation was modified downstream of Sema3E signaling. To do so, we treated starved subicular neurons with Sema3E for 11 min and monitored the phosphorylation status of the downstream effectors by western blot using appropriate antibodies (against Akt p-Ser473, GSK3 β p-Ser21/9 and CRMP4 p-Thr509) (Figure 9C). As expected, Sema3E treatment triggered the signaling cascade with an increase in Akt and GSK3 β phosphorylation ($203\% \pm 35$ and $153\% \pm 9.5$ of the control, respectively). In the same experiments, a considerable decrease in CRMP4 phosphorylation ($43\% \pm 5.4$ of the control) was observed. This decrease strongly suggests that the phosphorylation state of CRMP4 is regulated by Sema3E signaling.

We next investigated whether the Sema3E signaling cascade depends on DRM integrity. Subicular neurons were once again treated with Sema3E for 11 min in the presence of M β CD. Depleting cholesterol using M β CD (Ohtsuka et al., 2017; Raghu et al., 2010; Scheinman, Rostoker, & Leroith, 2013) inhibits the basal PI3k/AKT pathway ($46\% \pm 15$ and $65\% \pm 12$ of control signal for p-AKT and p-GSK3 β , respectively). In the presence of M β CD, the application of Sema3E does not lead to increased phosphorylation of p-AKT and p-GSK3 β ($106\% \pm 8$ and $99\% \pm 6$, respectively), nor to a decrease in CRMP4 phosphorylation ($108\% \pm 8$).

Together, these results show that CRMP4 is a downstream effector of Sema3E signaling, activation of the pathway leads to a decrease in its phosphorylation on Thr509. Furthermore, depletion of membrane cholesterol blocks activation of the Akt/GSK3 β pathway downstream of Sema3E stimulation.

CRMP4's cytoskeleton-binding domain is required for Sema3E signaling

The phosphorylation sites of CRMPs regulated by GSK3 β are located in the C-terminal region of these proteins, at the interaction sites with the cytoskeleton (Figure 10A). Cdk5 and DYRK2 phosphorylate Serine 522 in CRMP4, priming it for subsequent phosphorylation on Serine 518, Threonine 509 and Threonine 514 residues by GSK3 β . Sema3A has been shown to trigger CRMP2 phosphorylation at these sites, resulting in a disruption of its interaction with microtubules to allow axon repulsion (Fukata et al., 2002; Uchida et al., 2005). Our data show that axonal stimulation of subicular neurons with Sema3E is associated with a subsequent decrease in CRMP4 phosphorylation (Figure 9C), suggesting that the unphosphorylated form of CRMP4 transduces the signal downstream of Sema3E.

To assess this possibility, CRMP4-KO subicular neurons were transfected with plasmids encoding a non-phosphorylatable CRMP4 (CRMP4-4A) or a phosphomimetic CRMP4 for priming and GSK3 β sites (CRMP4-4D). These cells were then used to evaluate the impact of these mutations following Sema3E stimulation (Figure 10A). Surprisingly, both mutant forms of CRMP4 restored the axonal growth induced by addition of Sema3E (Figure 10B, 134% and 141% of control, respectively, $p < 0.0001$ in both cases).

lacking its cytoskeleton-binding domain (Figure 10A, CRMP4 Δ Cyto). This domain corresponds to the last 103 residues of the protein, encompassing the priming site and the GSK3 β phosphorylation sites (Mohamad R Khazaei et al., 2014). CRMP4 Δ Cyto no longer restored Sema3E-induced axonal growth (Figure 10C, 108% of control, $p = 0.1985$). These results indicate that, upon Sema3E stimulation, the cytoskeleton-binding domain of CRMP4 is required to promote axonal growth.

DISCUSSION

In this study, we characterized CRMP4 as a new specific effector of Sema3E-mediated axonal growth. This pathway is necessary for the development of the fornix, an essential brain structure. We have previously proposed that MAP6 acts as a scaffold protein within subicular neurons, facilitating the interaction of Sema3E pathway receptors and downstream SH3-containing actors (Deloulme et al., 2015). Building on this knowledge, we identified CRMPs as additional effector candidates thanks to their interactions with MAP6.

Here, we showed that CRMP4 knockdown suppresses axonal growth in subicular neurons in response to Sema3E stimulation. Axons from these cells mostly constitute the post-commissural part of the fornix. In addition, CRMP4-KO mice had defects in fornix development that were identical to those reported in Sema3E-KO mice (Chauvet et al., 2007). Finally, analysis of the fornix in *Crmp4/Sema3E* double heterozygote animals compared to single heterozygote animals revealed that *Crmp4* and *Sema3E* cooperate to allow the correct establishment of the fornix.

Taken together, these findings identified CRMP4 as a new effector of Sema3E-dependent axonal outgrowth implicated in fornix development. The involvement of CRMP4 in neurite outgrowth mechanisms has also been reported in the Sema3A pathway in another hippocampal neuron subtype. Thus, Sema3A stimulates the development of dendrites in a CRMP4-dependent manner (Niisato et al., 2011). In addition, CRMP4 and Sema3D genetically interact to promote axonal growth from some peripheral neuron populations in zebrafish (Tanaka et al., 2011).

These observations suggest a general role for CRMP4 in the attractive function of semaphorins. This property appears to be shared by other CRMPs, as both CRMP4 and CRMP1 are required to orient cerebral pyramidal neuron dendrites, and to position Purkinje cells in the developing mouse brain (Takaya et al., 2016; Yamazaki et al., 2020). Similarly, CRMP2 can rescue the inhibitory effects of CRMP4 knockdown on axonal development in cultured hippocampal neurons (Tan et al., 2015). Thus, CRMP1, CRMP2 and CRMP4 share some cellular functions and may have redundant roles that could be related to their extensive sequence homology, which ranges from 74% to 76% (Charrier et al., 2003).

However, our results show that downregulation of CRMP1 or CRMP2 does not affect the growth-promoting activity of Sema3E. These results suggest that CRMP4 plays a specific role in this signaling pathway. Interestingly, we found that knockdown of CRMP4 using siRNA stimulated basal axonal growth in cultured subicular neurons. This observation suggests that CRMP4 alone can repress axonal outgrowth in these particular neurons. Conversely, other authors report that CRMP4 promotes growth of axons as well as dendrites from neurons in the hippocampus or olfactory bulb (Cha et al., 2016; Cole et al., 2004; Mohamad R Khazaei et al., 2014; Tan et al., 2015; Tsutiya et al., 2016). Our research thus contributes to a growing body of work proposing that CRMP4 function is regulated by the molecular context of the neurons where it is expressed (Alabed et al., 2007; Duplan et al., 2010; Girouard et al., 2020; Niisato et al., 2012). Alternatively, it has been suggested that the antagonistic roles of CRMP4 observed in distinct neuronal populations could be due to differences in its phosphorylation state (Tanaka, Morimura, & Ohshima, 2012).

CRMP4-KO mice display dendritic arborization defects in hippocampal CA1 and cortical pyramidal neurons, mispositioning of Purkinje cells, and olfactory bulb lamination defects (Takaya et al., 2016; Tsutiya et al., 2016; Yamazaki et al., 2020). Here, we additionally show that a knockout of CRMP4 is associated with a defect in post-commissural fornix development, leading to a reduction of this tract associated with fasciculation defects persisting into adulthood. This tract is crucial for cognitive functions, and in line with this role, recent investigations of white matter microstructure by diffusion tensor imaging (DTI) across psychiatric disorders have highlighted alterations of the fornix in patients suffering from both schizophrenia and autism spectrum disorders (ASD) (Koshiyama et al., 2020). Moreover, a *de novo* variant of *Crmp4* was recently identified in an adult males with ASD, and CRMP4-KO mice show a decrease in social interaction as well as a severe alterations to their sensory responses (Tsutiya et al., 2017). It is therefore possible that the fornix alterations we observed in CRMP4-KO mice here may contribute to these behavioral defects.

Through this study, we demonstrated that CRMP4 interacted with the Sema3E tripartite receptor complex, specifically interacting with Nrp1 and PlxD1. Complex formation between CRMP1, CRMP2 and CRMP4, and PlxA1 - a Sema3A co-receptor - has been known for several years (Deo et al., 2004; Schmidt et al., 2008). More recently, a study showed that the direct interaction of CRMP2 with PlxA3 was involved in dendritic growth under the control of Sema3A (Jiang et al., 2020). Binding of CRMP2 to the Ngr1 receptor and PlxA2 induced by Nogo-A was also demonstrated to limit axonal regrowth after injury (Sekine et al., 2019). In our study, we demonstrated that CRMP4 and Sema3E receptor interaction occurs only in DRM domains, despite the fact that these domains contain only small amounts of these proteins. In this context, DRM is used as a broad term for a family of membrane domains resistant to high detergent concentrations, which includes lipid rafts. Thus, according to the methods used (sucrose gradients after solubilization in 1% triton X-100 and following M β CD treatment), we opted to use the broad term DRM. Here, we show that M β CD, by destabilizing DRM, inhibits the stimulation of Sema3E-dependent axonal growth and blocks downstream activation of the Akt/GSK3 β signaling pathway. Our results are consistent with studies highlighting the involvement of DRM/rafts in the Sema3A signaling pathway. For example, in leukemic T cells, Sema3A/Fas-dependent apoptosis requires Nrp1 and plexin-A1 to co-localize within lipid rafts (Moretti et al., 2008). Lipid rafts are also involved in Sema3A-induced growth cone collapse in neurons following the recruitment of Nrp1 to the rafts (Guirland et al., 2004). The presence of CRMP4 in membrane domains has been implicated in the maintenance of growth cones, suggesting that this localization places CRMP4 in an environment containing specific signaling proteins and cytoskeletal elements (Rosslénbroich et al., 2003). Furthermore, cerebral ischemia induced by occlusion led to CRMP4 and Nrp1 recruitment to lipid rafts, which hints that these molecules play a role in mediating signal transduction in response to neuronal damage triggered by ischemia-reperfusion (Whitehead, Gangaraju, Slinn, & Hou, 2010). Other effectors of the Sema3E signaling pathway, such as Akt, are involved in a myriad of cellular processes and have also been localized within DRM. Indeed, for particular cellular processes like axonal growth, Akt must localize to regions enriched in sphingolipids and cholesterol (Gao & Zhang, 2008). Our results support the idea that DRM/lipid rafts regulate the spatiotemporal recruitment of Sema3E-specific receptors in order to recruit ubiquitous effectors such as Akt or GSK3 β to specific membrane compartments (Averaimo et al., 2016; Lingwood & Simons, 2010). Sema3E axonal growth-promoting activity relies on the PI3K/Akt pathway, as it leads to downstream phosphorylation-induced inactivation of GSK3 β (Bellon et al., 2010). In line with this hypothesis, we also observed that Sema3E increased phosphorylation of both Akt and GSK3 β ,

to produce an inactive form of the latter, and thus decreased CRMP4 phosphorylation on Thr509, one of the three GSK3 β phosphorylation sites (Cole et al., 2004). Conversely, Sema3A's repulsive activity was associated with sequential phosphorylation of CRMP2 by Cdk5 and then by GSK3 β , blocking interaction between CRMP2 and microtubules in DRG-derived neurons (Uchida et al., 2005).

Therefore, GSK3 β -dependent phosphorylation of CRMPs can be considered to be a mechanism regulating CRMP activity in response to the attractive or repulsive effects of the guidance molecules. However, results from our rescue experiments in CRMP4-KO neurons tend to suggest that the phosphorylation state of CRMP4 has little direct impact on axonal growth in response to Sema3E. Indeed, CRMP4-4A and CRMP4-4D constructs both restored the response to Sema3E in CRMP4-KO neurons. One explanation for this result could be that CRMP4 phosphorylation alters its localization rather than its cytoskeleton modulatory function. This phosphorylation-dependent localization could have been bypassed following electroporation of CRMP4 plasmids, resulting in ubiquitous overexpression of CRMP4 mutants. This hypothesis has previously been proposed for the response to Sema3D (Tanaka et al., 2012). In contrast, the construct deleted for the region comprising the cytoskeleton domain (CRMP4 Δ Cyt) did not allow recovery of axonal-growth stimulation by Sema3E, reflecting the importance of the regulatory role played by CRMP4 on the cytoskeleton.

in axonal-growth induction, modulating cytoskeletal dynamics to mediate axonal growth. The results presented here thus identify CRMP4 as a major new player in the growth-promoting activity of Sema3E, a signaling pathway that is much less well-characterized than the repulsive role played by Sema3E in axon guidance.

MATERIALS AND METHODS

Animals

The study protocol was approved by the local animal welfare committee (Comité Local GIN, C2EA-04 – APAFIS number 8303-2016060110523424) and complied with EU guidelines (directive 2010/63/EU). Every precaution was taken to minimize the number of animals used and stress to animals during experiments.

All mouse lines used in this study were on a C57BL6 genetic background. CRMP4-KO (Mohamad R Khazaei et al., 2014) and their WT littermates were obtained by crossing CRMP4-heterozygous mice. Single and double CRMP4/Sema3E heterozygotes and their WT littermates were obtained by crossing CRMP4-heterozygote with Sema3E-heterozygote mice. Thy1-eYFP

line H mice (Feng et al., 2000) were obtained from Jackson Labs (B6.Cg-Tg(Thy1-YFP)HJrs/J, RRID:IMSR_JAX:003782

) and crossed with heterozygous CRMP4 mice to generate the heterozygous Thy1-eYFP CRMP4 mouse colony. These mice were then crossed with heterozygous CRMP4 mice to generate WT/ and KO/Thy1-eYFP-H littermate mice in inbred F1. Male and/or female mice were used from E17.5 prenatal day up to 4 months old, depending on the experiments.

Antibodies

The following primary antibodies were used: rabbit pan-MAP6 Ab 1:1000 (23N; homemade according to (Guillaud et al., 1998), 1:2000 in WB), mouse MAP6-N mAb (mAb-175, homemade as described in (Pirrollet, Rauch, Job, & Margolis, 1989), 1:1000 in WB), rabbit pan-CRMPs Ab directed against the C-terminal end of CRMP2 (RIVAPPGGRANITSLG) and recognizing CRMP1, 2 and 4 isoforms (unpublished data) (C-ter; homemade, 1:5000 in WB), rabbit anti-CRMP1 (HPA035640, Sigma, RRID:[AB_10670838](#)), mouse anti-CRMP2 (C4G, IBL-America, USA, RRID:[AB_1630812](#), 1:500 in WE), rabbit CRMP4 Ab (TUC-4, Millipore, Molsheim, France, RRID:[AB_91876](#))(1:4000 in WB; 1:1000 in IF), rabbit phospho-CRMP4 (Thr509, homemade according to (Alabed et al., 2010), 1:5000 in WB), goat Nrp1 Ab (AF566, Bio-technie, Noyal-Châtillon-Sur-Seiche, France, RRID:[AB_355445](#), 1:2000 in WB, 1:800 for IF), goat PlexD1 Ab (AF4160, Bio-technie, RRID:[AB_2237261](#), 1:2000 in WB), rabbit turbo GFP Ab (PA5-22688, Thermo Fisher, Lyon, France, RRID:[AB_2540616](#)) (1:5000 in WB), rabbit VEGFR2 mAb (2479, Cell Signaling Technology, Ozyme, Saint-Cyr-l'Ecole, France, RRID :[AB_2212507](#)) (1:2000 in WB), mouse flotillin Ab (610384, BD Biosciences, Pont de Claix, France, RRID:[AB_397767](#)) (1:2000 in WB), rabbit Akt pan mAb (4685, Cell Signaling Technology, RRID:[AB_2225340](#)) (1:5000 for WB), rabbit phospho-Akt Ab (Ser473, 9271, Cell Signaling Technology, RRID:[AB_329825](#)) (1:5000 in WB), rabbit GSK-3 α/β mAb (5676, Cell Signaling Technology, [AB_10547140](#))(1:2000 for both WB and IF), rabbit phospho-GSK-3 α/β (Ser21/9) Ab (9331, Cell Signaling Technology, RRID:[AB_329830](#)) (1:2000 for both WB and IF), mouse α -tubulin (clone α 3A1, 1:3000 in IF), rabbit anti-GAPDH (G9545, Sigma, RRID:[AB_796208](#)) (1:6000 in WE) . All secondary antibodies were purchased from Jackson Immuno Research (Interchim, Montluçon, France).

Cell lines

HEK293T/17 were obtained from the ATCC, (RRID:CVCL_4V93), cultured in DMEM medium, 10% FBS and 1% Penicillin/Streptomycin, authenticated using STR profiling and routinely

checked for no mycoplasma contamination using MycoSEQ detection system (Thermo-Fisher, France).

Plasmids

Plasmids coding for human VSV-PlxD1 (Rohm, Ottemeyer, Lohrum, & Püschel, 2000), rat FLAG-Nrp1 (He & Tessier-Lavigne, 1997), and human VEGFR2-FLAG (Lamallice, Houle, & Huot, 2006) were used. The plasmid coding for human CRMP4-tGFP (aa 1-570, in pCMV6-AC-tGFP) was from Origene (Rockville, USA) (RG230865, # NM_001197294, NP_001184223). Derivations of this plasmid were CRMP-4A-tGFP and CRMP-4D-tGFP, in which Thr509, Thr514, Ser518, and Ser522 residues were replaced by four alanine residues or four glutamate residues, respectively. The plasmid coding for mouse CRMP4-eGFP (aa 1-570 of NP_033494, in pCAG) was homemade. A derivation of this plasmid, CRMP4 Δ Cyto-eGFP, was also produced following the deletion of the sequence coding for aa 468-570. pET21-based plasmids (pET21a(+), Novagen) were produced coding for mouse His-CRMP1 (aa 1-572 of NP_031791), mouse His-CRMP2 (aa 1-572 of NP_034085), and mouse His-CRMP4 (aa 1-570 of NP_033494).

Brain fixations

Adult mice were fixed by transcardiac perfusion with a 4% formaldehyde solution as previously described (Daoust et al., 2014). Brains were then extracted and post-fixed in 4% formaldehyde solution overnight at 4 °C. Embryos (E18.5 days) and perinatal (P0 and P2 days) pups were decapitated and their brains were dissected and then fixed by incubation in a 4% formaldehyde solution at 4 °C for 4-5 h. All brains are cryoprotected by immersion in sucrose solutions (15% then 30% at 4 °C) until the brains sank and then frozen at -80 °C in a dry-ice isopentane-bath (528471, Carlo Erba, Peypin, France).

Histology and immunolabeling

The white matter of floated coronal sections was stained using the gold chloride method described by Schmued (Schmued et al., 2008). Brain sections were mounted on SuperFrost plus slides (VWR, Fontenay-Sous-Bois, France), counterstained with Cresyl violet and then dehydrated in successive ethanol baths. Slices were mounted in DPX mounting medium. Each section was digitized (stereo microscope EZ4 HD, Leica Biosystem, Nanterre, France). Fornices and mammillary tracts were analyzed using ImageJ software at three anterior-posterior planes selected based on morphometric landmarks (Franklin & Paxinos, 2008). The first plane

corresponds to the beginning of the dorsal hippocampus (Bregma: -0.94 mm), the second corresponds to the complete achievement of the dentate gyrus (Bregman: -1.34 mm), and the most posterior plane corresponds to the emergence of the habenular commissure (Bregma: -2.30 mm). The regions of interest (ROIs) of the fornices and the mammillo-thalamic tract were manually drawn and a threshold applied to measure tract surface cross-sections using ImageJ software (Schindelin et al., 2012). The fasciculation index was determined by dividing the smallest circle area including all fornix fibers by the fibers' area within the ROI.

IBrain sections (40 μ m) mounted on SuperFrost plus slides were immunostained. Coronal and sagittal (with a cutting angle of 30°) sections from pups were permeabilized in PBS-GTS (20012-019, Gibco, ThermoFisher, Dardilly, France), containing 0.2% gelatin (24350.262, VWR), 0.5% Triton X-100 (T9284, Sigma, Saint-Quentin-Fallavier, France), 0.05% Saponin (47036, Fluka, Sigma), for 1 h, and extensively washed with PBS. Rabbit anti-CRMP4 and/or goat anti-Nrp1 antibodies were diluted in PBS-GTS at 1:1000 and 1:800, respectively, and incubated overnight at RT. Brain sections were extensively washed with PBS-GTS before incubating with a mixture of secondary antibodies coupled to Alexa 488 or Cy3 for 2 h at RT. Sections were extensively washed with PBS-GTS followed by PBS, and slices were mounted with fluorescent mounting medium (S3023, DAKO-Agilent, Santa Clara, USA).

QThe post-commissural length was quantified on 30° sagittal sections, and the diameters of the post-commissural fornix and mammillo-thalamic tract were measured on the same coronal section, corresponding to the onset of the anterior part of the AHA. Each section was digitized using an optical microscope (Axioskop 50, Zeiss, Oberkochen, Germany) equipped with a 20x (0.8 NA) dry objective and an EMCCD Quantum camera controlled by Metamorph software (Roper Scientific, Paray-Vieille-Poste, France). All morphometric measurements were taken using ImageJ software.

Whole-mount immunostaining and tissue clearing

In this study, we used three tissue clearing methods: 3DISCO (Figure 4C, (Belle et al., 2014)), iDISCO (Figure 5, (Renier et al., 2014)), and a hybrid uDISCO method that we developed from three other protocols (Figure S2, (Hahn et al., 2019; Li, Xu, Wan, Yu, & Zhu, 2018; Pan et al., 2016) (see supplementary material).

3DISCO: Whole brains from WT and CRMP4-KO littermate pups (E18.5-P2) were thawed and rehydrated in PBS at 4 °C for 4 h. Brains were permeabilized in PBS-GTS buffer containing 0.01% Thimerosal (T5125, Sigma) overnight at 37 °C and then incubated for 1 week at 37 °C with anti-Nrp1 primary antibody (1:400) diluted in PBS-GTS buffer. After extensive washing,

brains were incubated for 5 days with anti-goat Cy3-conjugated secondary antibody (1:500) in PBS-GTS. Brains were then cleared as previously described (Belle et al., 2014). Whole-brain images were acquired using a confocal microscope (LSM710, Zeiss) with 10 x dry objective (NA: 0.3; WD: 5.5 mm) in the horizontal plane ($x = 2.08$; $y = 2.08$; $z = 6.55 \mu\text{m}$). Post-commissural fornices were segmented manually for each z position using the ImageJ Segmentation Editor plugin (Schindelin et al., 2012), and then 3D-reconstructed to produce illustrations.

iDISCO: Immunolabeling and clearing of whole brain from WT, *Sema3e*^{+/-}, *Crmp4*^{+/-} and *Crmp4*^{+/-}*Sema3e*^{+/-} newborn littermates were performed according to the *iDISCO* protocol (Renier et al., 2014). Nrp1 immunolabeling was processed as above, and brains were embedded in 0.5% agarose (2267.1, Roth, Karlsruhe, Germany) before applying the clearing procedure. Cleared brains were 3D-imaged on a lightsheet fluorescence microscope (Ultramicroscope II, LaVision BioTec, Bielefeld, Germany) using a 2 x long working distance air objective lens (WD 6 mm with the dipping cap) and InspectorPro software (LaVision BioTec). Acquisitions on the horizontal plane were obtained using Dynamic Focus with a constant lightsheet thickness of $4.1 \mu\text{m}$ ($x = 3.02$; $y = 3.02$; $z = 3 \mu\text{m}$). 3D volume images were generated using Imaris software (version 9.6, Bitplane) (Oxford Instrument, Gometz-la-Ville, France). Fornices and mammillary tracts were manually segmented using the 'Isoline' drawing mode (Imaris) by creating a mask.

Neuron culture

Brains from WT and CRMP4-KO littermate embryos (E17.5) were dissected to obtain the subiculum. Pieces were dissociated and plated on poly-lysine/laminin-coated coverslips in DMEM supplemented with 10% horse serum and 1% penicillin/streptomycin. After 2 h, the medium was replaced with Neurobasal medium supplemented with 1 mM glutamine, 1:50 B27 (Gibco), and treated with 5 nM alkaline phosphatase fused with Sema3E (AP-Sema3E). The AP-Sema3E and alkaline phosphatase controls (AP-Ctrl) were produced as previously described (Chauvet et al., 2007). The effect of methyl- β -cyclodextrin (M β DC, C4555, Sigma) on Sema3E-induced axonal-growth stimulation was investigated as follows. M β CD (final concentration 0.5, 1.0, or 1.5 mM) was added to the culture medium when neurons were seeded, and incubated for 2 h. The medium was then switched to supplemented Neurobasal medium, and neurons were treated with AP or AP-Sema3E for 24 h before measuring axonal lengths.

In some experiments, neurons were electroporated (Amaxa Cell Line Nucleofector, Lonza Bioscience) either with several plasmid constructs coding for CRMP4 variants (100 pmol) or

with distinct siRNAs (20 nM). Efficient knockdown of CRMP1, CRMP2 and CRMP4 was obtained using Stealth RNAi (Invitrogen, ThermoFisher), siRNA anti-*Crmp1* sequence 5'-CCC GGU GGC AUU GAU GUC AAC ACU U-3' (si-*Crmp1*), siRNA anti-*Crmp2* sequence 5'-CCA ACC ACU CCA GAC UUU CUC AAC U-3' (si-*Crmp2*), siRNA anti-*Crmp4* sequence 5'-CCU CUG GUG GUU AUC UGC CAG GGC A-3' (si-*Crmp4*). After 2 DIV, cultured cells were fixed, immunolabeled with an anti-tubulin antibody and digitized using an optical microscope (Axioskop 50, Zeiss) equipped with a 20 x (0.5 NA) dry objective (Figure 2) or using a slide scanner (Axio Scan Z1, Zeiss) equipped with a 20 x (0.8 NA) dry objective (Figure 9 and 10). Axonal lengths were automatically measured for isolated neurons using the AutoNeuriteJ macro (Boulan et al., 2020).

Phosphorylation patterns in cultured neurons

ubicular neurons cultured in Petri dishes (B35, Falcon) at 2 DIV were starved for 2 h in Neurobasal medium without supplements, and were successively treated or not with 4 mM of M β CD for 30 min. Cultures were then treated with 5 nM of AP or AP-Sema3E for 11 min before harvesting. Neurons were lysed in 150 μ L of Laemmli buffer containing 100 mM DTT. The phosphorylation state of Akt, GSK3 β and CRMP4 was investigated after separation on SDS-PAGE (4-15%) electrotransfer onto nitrocellulose membrane, and immunoblotting (Bio-Rad, Marne-la-Coquette, France).

Immunoaffinity chromatography and mass spectrometry-based proteomic analyses

Purified monoclonal antibodies directed against MAP6-N peptide-175 (mAb-175, 10 mg) were coupled on AminoLink coupling gel column (Thermo Scientific, Illkirch, France) following the manufacturer's instructions.

Twenty WT adult brains were lysed in 8 mL of PEM buffer (100 mM PIPES adjusted to pH 6.75 with KOH; 1 mM EGTA; 1 mM MgCl₂ and protein inhibitor cocktail) by performing 6 strokes with the type A pestle and 2 strokes with type B pestle of a Kontes all-glass Dounce homogenizer at 4 °C. Homogenates were centrifuged at 70 000 g for 10 min, and supernatants were incubated with 1 mL of mAb-175-aminolink gel for 3 min at 4 °C with gentle agitation. mAb-175-aminolink gel was extensively washed with PEM buffer containing 50 mM NaCl before eluting bound proteins with 4 mL of peptide-175 (1 mM in PEM buffer). Proteins from more concentrated eluted fractions were partially separated on an SDS-PAGE gel (NuPAGE 4-12%, ThermoFisher Scientific) and stained with Coomassie blue (R250, Bio-Rad). Migration lanes were cut into 21 bands, and proteins were oxidized as previously described (Jaquinod et

al., 2012) before in-gel digestion with modified trypsin (sequencing grade, Promega, Charbonnières-Les-Bains, France) (Casabona, Vandenbrouck, Attree, & Couté, 2013).

Resulting peptides of each band were sequentially analyzed by online nanoLC-MS/MS (UltiMate 3000 and LTQ-Orbitrap Velos, Thermo Scientific). For this, peptides were sampled on a 300 μm x 5 mm PepMap C18 precolumn (Thermo Scientific) and separated on a homemade 75 μm x 150 mm C18 column (Gemini C18, Phenomenex). MS and MS/MS data were acquired using Xcalibur (Thermo Scientific).

Mascot Distiller (Matrix Science) was used to produce mgf files before identification of peptides and proteins using Mascot (version 2.7) through concomitant searches against Uniprot (Mammalia, march 2021 version; taxon *Mus Musculus*), classical contaminants database (homemade) and the corresponding reversed databases. The Proline software (Bouyssie D et al., Bioinformatics, 2020) was used to filter the results (conservation of rank 1 peptides, minimum peptide score of 25, and minimum of two peptides including one specific peptide per protein group identified).

Expression of recombinant proteins and pull-down

For recombinant production of CRMP proteins, *E. Coli* BL21(DE3) pLysS (Fisher Scientific, Illkirch, France) were transformed by pET21-*Crm*ps plasmids and protein expression was induced with 1 mM isopropyl-1-thio- β -D-galactopyranoside for 6 h at 37 °C. Bacteria were harvested by centrifugation at 5 000 g (10 min at 4 °C). The pellet was resuspended in 40 mM Tris-HCl pH 7.5, 300 mM NaCl, 0.1% Triton X-100, 6 mM imidazole with protease inhibitor cocktail (04693132001, Merck-Roche, Lyon, France) and lysed by three successive freezing and thawing cycles combined with sonication (3 \times 10-s bursts). After centrifugation (200 000 g, 40 min at 4 °C), the supernatant was added to a cobalt resin column (Fisher Scientific, 10 mL of lysate to 1 mL of beads for 1 h at 4 °C) and washed with lysis buffer. The His-tagged CRMP proteins were eluted with 40 mM Tris-HCl pH 7.5, 300 mM NaCl, 200 mM imidazole with protease inhibitor cocktail and dialyzed against 100 mM NaHCO₃ pH 8.3, 500 mM NaCl. Recombinant CRMPs were coupled to CNBr-Sepharose (17-0430-01, Merck-Roche, 1.4 mg of protein per milliliter of beads) as described in the manufacturer's protocol. The MAP6-N-His recombinant protein was produced in baculovirus and purified as previously described (Cuveillier et al., 2020).

For pull-down experiments, recombinant MAP6-N-His (2 μg) was incubated with 5 μL of control-Sepharose or CRMP-Sepharose beads in PEM buffer (100 mM PIPES, 1 mM EGTA, 1 mM MgCl₂, 100 mM KCl, 0.05% Tween 20, pH 7.5) in the presence of protease inhibitors

for 20 min at RT. Beads were washed three times with PEM buffer and resuspended in 40 μ L Laemmli buffer containing 100 mM DTT. Recovered proteins were analyzed by Coomassie staining after SDS-PAGE.

Co-immunoprecipitation

For brain immunoprecipitation experiments, adult brains were homogenized with lysis buffer (20 mM Tris-HCl pH 7.2, 1 mM EGTA, 1 mM EDTA, 5 mM NaF, 1 mM DTT, 0.27 M sucrose, 0.5% Triton X-100) in the presence of protease inhibitor cocktail. After mechanical lysis using ceramic beads (Precellys, VWR) shaking and centrifugation of the cell lysate at 12 000 g for 20 min at 4 °C, the supernatant was diluted 3x with buffer C (10 mM Tris-HCl pH 7.5, 2% glycerol) and incubated for 4 h at RT with 20 μ g of MAP6 antibody (mAb175). For immunoprecipitation on cells, HEK293T/17 cells were transfected with plasmids encoding CRMP4-tGFP, VEGFR2-FLAG, VSV-PlxD1 and FLAG-Nrp1 using a calcium phosphate transfection kit (631312, LifeTechnologies, ThermoFisher). One day after transfection, cells were lysed as described previously for brains. To test the detergent resistance of the interaction between CRMP4 and the receptors, a lysis buffer containing 1% instead of 0.5% of Triton X-100 was used. The supernatant was incubated for 1 h at 4 °C with an anti-tGFP, anti-CRMP4 (TUC4) or anti-VEGFR2 antibody, and then in the presence of Dynabeads Protein G (10004D, Invitrogen, ThermoFisher). Beads were washed with a buffer containing 20 mM Tris-HCl pH 7.2, 1 mM EDTA, 500 mM NaCl, and 0.2% NP40. Proteins were then resuspended in 20 μ L of Laemmli buffer containing 100 mM DTT and analyzed by western blot as described above.

Sucrose-density gradient fractionation

For sucrose-density gradient fractionation, five cultures of HEK293T/17 cells in individual Petri dishes (B100, Falcon, Dutscher, Bernolsheim, France) were transfected with *Crmp4*-tGFP, VSV-*PLXND1*, and FLAG-*Nrp1* cDNAs. After 24 h, cultures were left untreated or treated with 10 mM MBCD and then lysed in 50 mM HEPES pH 7.4, 150 mM NaCl, 5 mM EDTA, in the presence of protease inhibitors. The homogenate was vortexed for 1 h in the presence of 1% Triton X-100 at 4 °C then centrifuged at 12 000 g for 20 min at 4 °C. Supernatant was recovered (1.5 mL) and adjusted to 40% sucrose by adding 1.5 mL of 80% sucrose in lysis buffer, placed under a 5-38% discontinuous sucrose gradient and centrifuged at 274 000 g for 16 h at 4 °C in Beckman SW-41Ti rotor. Fractions (12 x 1 mL each) were harvested from the top of the tube.

Experimental design and statistical analyses

E17.5-day CRMP4-KO and WT littermate embryos were obtained by crossing CRMP4-heterozygous mice. WT and KO were distinguished from heterozygote littermates based on X-Gal staining intensity of the midbrain and hindbrain. Subicula from each genotype (WT or CRMP4-KO) were pooled and the genotype of each embryo was confirmed by tail-PCR. Sema3E growth-promoting activity on siRNA-treated neurons or CRMP4-KO neurons (Figure 2) was analyzed on three independent cultures using 75 randomly selected neurons for each condition (2 coverslips per condition). Analyses of Sema3E growth-promoting activity on M β CD-treated neurons were performed on two independent cultures using 300 randomly selected neurons for each condition (2 coverslips per condition) (Figure 9 A-B). Sema3E growth-promoting activity on rescued neurons was analyzed on 2 to 3 independent cultures, as indicated in the figure legend, using 300 randomly selected neurons for each condition (2 coverslips per condition) (Figure 10). The box-and-whisker plots show the normalized axonal length (in %) compared to the siRNA control (Figure 2B) or to the AP control (AP-CtrL) condition (Figure 2D, E, and F). Statistical comparison between AP-CtrL and AP-Sema3E treated neuron axonal lengths was based on a Kruskal-Wallis non-parametric test followed by Dunn's multiple comparisons.

P0 *Crmp4^{+/-}Sema3e^{+/-}*, *Sema3e^{+/-}*, *Crmp4^{+/-}* and WT littermates were obtained by crossing CRMP4-heterozygote animals with Sema3E-heterozygote mice. Statistical comparison between different genotypes and WT was based on a Kruskal-Wallis non-parametric test followed by Dunn's multiple comparisons.

Statistical analyses

statistical analyses were performed using Prism 9.0 software (GraphPad Software), applying the tests indicated in each figure. Researchers were blind to the genotypes during data collection and analysis.

Supplemental Materials and Methods

Brain lysates

After euthanasia, by decapitation for E15.5, E17.5, P0 embryos or anesthetic overdose for later stages, brains were dissected out and lysed in buffer (20 mM Tris-HCl pH 7.4, 150 mM NaCl, 1 mM EDTA, 1 mEGTA, 1mMDTT, 1 mM MgCl₂, 1% Triton X100 and protease inhibitors) by 6 strokes with the type A pestle and 2 strokes with type B pestle of a Kontes all-glass Dounce homogenizer. Protein amounts between samples were equilibrated following assessment of the

protein concentration by Bradford assay. An aliquot of proteins (20 µg) for each sample was loaded onto a 10% acrylamide gel for western blotting.

Brain section X-Gal staining

E17.5 brains were incubated in 0.2% glutaraldehyde and 2% formaldehyde in PBS for 2 h. Brain slices (50 µm) were incubated in PBS containing 5 mM potassium ferricyanide, 5 mM potassium ferrocyanide, 2 mM magnesium chloride and 1 mg / mL X-Gal as substrate for 3-5 h at 30 °C. Slices were dehydrated and then mounted in DPX.

Tissue clearing

Hybrid uDISCO: Adult half-brains from WT/Thy1-eYFP-H and CRMP4-KO/Thy1-eYFP-H mice were cleared using a protocol adapted from three published methods (Hahn et al., 2019; Li et al., 2018; Pan et al., 2016). Brains were first dehydrated in increasing tert-butanol concentrations (30, 50, 70, 80, 90, 100, and 100%^{v/v}). Each bath lasted 12 h at 32 °C, and pH was adjusted to 9.0–9.5 by adding triethylamine (0.5, 0.5, 0.5, 1, 3, 15, 60 and 60 µl TEA/15 ml, respectively) (471283, Sigma) (Li et al., 2018; Pan et al., 2016). Brains were then immersed in dichloromethane (270997, Sigma) for 60 min at room temperature to remove lipids. Finally, brains were cleared for 5 h at room temperature in di-benzyl ether (108014, Sigma) containing 0.4% N-propyl-gallate (P3130, Sigma) (Hahn et al., 2019) and washed twice in ethyl cinnamate (112372, Sigma). All incubation steps were performed in a 15-mL tube filled with solution, under mild agitation and protected from light.

ACKNOWLEDGMENTS

The authors thank O. Valiron for initial experiments on MAP6 neuronal partners; S. Andrieu, F. Mehr, L. Romain and F. Rimet for animal care; F. Vossier, C. Corrao, L. De Macedo and N. Chaumontel for technical support; C. Dominici for her advice and expertise in the use of Imaris; Thomas Brown for his comments and manuscript corrections. C.R. and J.C.D particularly thank I. Arnal for the current financial and logistical support. This work was supported by INSERM, CEA, University Grenoble Alpes and in part by funds awarded by the French Agence Nationale de la Recherche to A.A. (2010- Blanc-120201 CBioS and 2017-CE11-0026 MAMAs).

COMPETING INTERESTS

The authors declare no conflicts of interest

REFERENCES

- Ae, G. G., Gehrig-Burger, K., Gimpl, G., & Gehrig-Burger, Á. K. (2007). Cholesterol Reporter Molecules. *Biosci Rep*, 27, 335–358. <https://doi.org/10.1007/s10540-007-9060-1>
- Alabed, Y. Z., Pool, M., Ong Tone, S., & Fournier, A. E. (2007). Identification of CRMP4 as a convergent regulator of axon outgrowth inhibition. *The Journal of Neuroscience : The Official Journal of the Society for Neuroscience*, 27(7), 1702–1711. <https://doi.org/10.1523/JNEUROSCI.5055-06.2007>
- Alabed, Y. Z., Pool, M., Ong Tone, S., Sutherland, C., & Fournier, A. E. (2010). GSK3 beta regulates myelin-dependent axon outgrowth inhibition through CRMP4. *The Journal of Neuroscience : The Official Journal of the Society for Neuroscience*, 30(16), 5635–5643. <https://doi.org/10.1523/JNEUROSCI.6154-09.2010>
- Arbeille, E., Reynaud, F., Sanyas, I., Bozon, M., Kindbeiter, K., Causeret, F., ... Castellani, V. (2015). Cerebrospinal fluid-derived Semaphorin3B orients neuroepithelial cell divisions in the apicobasal axis. *Nature Communications*, 6. <https://doi.org/10.1038/ncomms7366>
- Averaimo, S., Assali, A., Ros, O., Couvet, S., Zagar, Y., Genescu, I., ... Nicol, X. (2016). A plasma membrane microdomain compartmentalizes ephrin-generated cAMP signals to prune developing retinal axon arbors. *Nature Communications*, 7. <https://doi.org/10.1038/ncomms12896>
- Belle, M., Godefroy, D., Dominici, C., Heitz-Marchaland, C., Zelina, P., Hellal, F., ... Chédotal, A. (2014). A simple method for 3D analysis of immunolabeled axonal tracts in a transparent nervous system. *Cell Reports*, 9(4), 1191–1201. <https://doi.org/10.1016/j.celrep.2014.10.037>
- Bellon, A., Luchino, J., Haigh, K., Rougon, G., Haigh, J., Chauvet, S., & Mann, F. (2010). VEGFR2 (KDR/Flk1) signaling mediates axon growth in response to semaphorin 3E in the developing brain. *Neuron*, 66(2), 205–219. <https://doi.org/10.1016/j.neuron.2010.04.006>
- Boulan, B., Beghin, A., Ravello, C., Deloulme, J.-C., Gory-Fauré, S., Andrieux, A., ... Denarier, E. (2020). AutoNeuriteJ: An ImageJ plugin for measurement and classification of neuritic extensions. *PloS One*, 15(7), e0234529. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0234529>
- Bubb, E. J., Kinnavane, L., & Aggleton, J. P. (2017). Hippocampal–diencephalic–cingulate networks for memory and emotion: An anatomical guide. *Brain and Neuroscience Advances*, 1(1), 239821281772344. <https://doi.org/10.1177/2398212817723443>
- Byk, T., Ozon, S., & Sobel, A. (1998). The Ulip family phosphoproteins--common and specific properties. *European Journal of Biochemistry / FEBS*, 254(1), 14–24. Retrieved from

<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/9652388>

- Casabona, M. G., Vandenbrouck, Y., Attree, I., & Couté, Y. (2013). Proteomic characterization of *Pseudomonas aeruginosa* PAO1 inner membrane. *Proteomics*, *13*(16), 2419–2423. <https://doi.org/10.1002/pmic.201200565>
- Cha, C., Zhang, J., Ji, Z., Tan, M., Li, S., Wu, F., ... Lin, H. (2016). CRMP4 regulates dendritic growth and maturation via the interaction with actin cytoskeleton in cultured hippocampal neurons. *Brain Research Bulletin*, *124*, 286–294. <https://doi.org/10.1016/j.brainresbull.2016.06.008>
- Charrier, E., Reibel, S., Rogemond, V., Aguera, M., Thomasset, N., & Honnorat, J. (2003). Collapsin response mediator proteins (CRMPs): involvement in nervous system development and adult neurodegenerative disorders. *Molecular Neurobiology*, *28*(1), 51–64. <https://doi.org/10.1385/MN:28:1:51>
- Chauvet, S., Cohen, S., Yoshida, Y., Fekrane, L., Livet, J., Gayet, O., ... Mann, F. (2007). Gating of Sema3E/PlexinD1 Signaling by Neuropilin-1 Switches Axonal Repulsion to Attraction during Brain Development. *Neuron*, *56*(5), 807–822. <https://doi.org/10.1016/j.neuron.2007.10.019>
- Cole, A. R., Causeret, F., Yadirgi, G., Hastie, C. J., McLauchlan, H., McManus, E. J., ... Sutherland, C. (2006). Distinct priming kinases contribute to differential regulation of collapsin response mediator proteins by glycogen synthase kinase-3 in vivo. *The Journal of Biological Chemistry*, *281*(24), 16591–16598. <https://doi.org/10.1074/jbc.M513344200>
- Cole, A. R., Knebel, A., Morrice, N. A., Robertson, L. A., Irving, A. J., Connolly, C. N., & Sutherland, C. (2004). GSK-3 phosphorylation of the Alzheimer epitope within collapsin response mediator proteins regulates axon elongation in primary neurons. *Journal of Biological Chemistry*, *279*(48), 50176–50180. <https://doi.org/10.1074/jbc.C400412200>
- Cuveillier, C., Delaroche, J., Seggio, M., Gory-Fauré, S., Bosc, C., Denarier, E., ... Delphin, C. (2020). MAP6 is an intraluminal protein that induces neuronal microtubules to coil. *Science Advances*, *6*(14), eaaz4344. <https://doi.org/10.1126/sciadv.aaz4344>
- Daoust, A., Bohic, S., Saoudi, Y., Debacker, C., Gory-Fauré, S., Andrieux, A., ... Deloulme, J. C. (2014). Neuronal transport defects of the MAP6 KO mouse - a model of schizophrenia - and alleviation by Epothilone D treatment, as observed using MEMRI. *NeuroImage*, *96*, 133–142.
- Davy, A., Gale, N. W., Murray, E. W., Klinghoffer, R. A., Soriano, P., Feuerstein, C., & Robbins, S. M. (1999). Compartmentalized signaling by GPI-anchored ephrin-A5 requires the Fyn tyrosine kinase to regulate cellular adhesion. *Genes and Development*, *13*(23),

3125–3135. <https://doi.org/10.1101/gad.13.23.3125>

- Deloulme, J.-C., Gory-Fauré, S., Mauconduit, F., Chauvet, S., Jonckheere, J., Boulan, B., ... Andrieux, A. (2015). Microtubule-associated protein 6 mediates neuronal connectivity through Semaphorin 3E-dependent signalling for axonal growth. *Nature Communications*, 6. <https://doi.org/10.1038/ncomms8246>
- Deo, R. C., Schmidt, E. F., Elhabazi, A., Togashi, H., Burley, S. K., & Stephen, M. (2004). Structural bases for CRMP function in plexin- dependent semaphorin3A signaling. *The EMBO Journal*, (December 2003), 9–22. <https://doi.org/10.1038/sj.emboj.7600021>
- Duplan, L., Bernard, N., Casseron, W., Dudley, K., Thouvenot, E., Honnorat, J., ... Pettmann, B. (2010). Collapsin response mediator protein 4a (CRMP4a) is upregulated in motoneurons of mutant SOD1 mice and can trigger motoneuron axonal degeneration and cell death. *The Journal of Neuroscience: The Official Journal of the Society for Neuroscience*, 30(2), 785–796. <https://doi.org/10.1523/JNEUROSCI.5411-09.2010>
- Feng, G., Mellor, R. H., Bernstein, M., Keller-Peck, C., Nguyen, Q. T., Wallace, M., ... Sanes, J. R. (2000). Imaging neuronal subsets in transgenic mice expressing multiple spectral variants of GFP. *Neuron*, 28(1), 41–51. [https://doi.org/10.1016/S0896-6273\(00\)00084-2](https://doi.org/10.1016/S0896-6273(00)00084-2)
- Foster, L. J., De Hoog, C. L., & Mann, M. (2003). Unbiased quantitative proteomics of lipid rafts reveals high specificity for signaling factors. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 100(10), 5813–5818. <https://doi.org/10.1073/pnas.0631608100>
- Franklin, K. B. J., & Paxinos, G. (2008). *The mouse brain in stereotaxic coordinates, 3th Edition*. Boston.
- Fukata, Y., Itoh, T. J., Kimura, T., Ménager, C., Nishimura, T., Shiromizu, T., ... Kaibuchi, K. (2002). CRMP-2 binds to tubulin heterodimers to promote microtubule assembly. *Nature Cell Biology*. <https://doi.org/10.1038/ncb825>
- Gao, X., & Zhang, J. (2008). Spatiotemporal analysis of differential Akt regulation in plasma membrane microdomains. *Molecular Biology of the Cell*, 19(10), 4366–4373. <https://doi.org/10.1091/mbc.e08-05-0449>
- Gao, X., & Zhang, J. (2009). Akt signaling dynamics in plasma membrane microdomains visualized by FRET-based reporters. *Communicative & Integrative Biology*, 2(1), 32–34. <https://doi.org/10.4161/cib.2.1.7420>
- Girouard, M.-P., Simas, T., Hua, L., Morquette, B., Khazaei, M. R., Unsain, N., ... Fournier, A. E. (2020). Collapsin Response Mediator Protein 4 (CRMP4) Facilitates Wallerian Degeneration and Axon Regeneration following Sciatic Nerve Injury. *Eneuro*, 7(2),

ENEURO.0479-19.2020. <https://doi.org/10.1523/ENEURO.0479-19.2020>

- Goshima, Y., Nakamura, F., Strittmatter, P., & Strittmatter, S. M. (1995). Collapsin-induced growth cone collapse mediated by an intracellular protein related to UNC-33. *Nature*, 509–514.
- Guillaud, L., Bosc, C., Fourest-Lieuvin, A., Denarier, E., Pirollet, F., Lafanechère, L., & Job, D. (1998). STOP proteins are responsible for the high degree of microtubule stabilization observed in neuronal cells. *Journal of Cell Biology*, 142(1), 167–179. <https://doi.org/10.1083/jcb.142.1.167>
- Guirland, C., Suzuki, S., Kojima, M., Lu, B., & Zheng, J. Q. (2004). Lipid rafts mediate chemotropic guidance of nerve growth cones. *Neuron*, 42(1), 51–62. [https://doi.org/10.1016/S0896-6273\(04\)00157-6](https://doi.org/10.1016/S0896-6273(04)00157-6)
- Hahn, C., Becker, K., Saghafi, S., Pende, M., Avdibašić, A., Foroughipour, M., ... Dodt, H.-U. (2019). High-resolution imaging of fluorescent whole mouse brains using stabilised organic media (sDISCO). *Journal of Biophotonics*, 12(8), e201800368. <https://doi.org/10.1002/jbio.201800368>
- He, Z., & Tessier-Lavigne, M. (1997). Neuropilin is a receptor for the axonal chemorepellent Semaphorin III. *Cell*, 90(4), 739–751. [https://doi.org/10.1016/s0092-8674\(00\)80534-6](https://doi.org/10.1016/s0092-8674(00)80534-6)
- Hérincs, Z., Corset, V., Cahuzac, N., Furne, C., Castellani, V., Hueber, A. O., & Mehlen, P. (2005). DCC association with lipid rafts is required for netrin-1-mediated axon guidance. *Journal of Cell Science*, 118(8), 1687–1692. <https://doi.org/10.1242/jcs.02296>
- Hou, S.-T. (2020). The regulatory and enzymatic functions of CRMPs in neuritogenesis, synaptic plasticity, and gene transcription. *Neurochemistry International*, 139, 104795. <https://doi.org/10.1016/j.neuint.2020.104795>
- Jaquinod, M., Trauchessec, M., Huillet, C., Louwagie, M., Lebert, D., Picard, G., ... Bruley, C. (2012). Mass spectrometry-based absolute protein quantification: PSAQ™ strategy makes use of “noncanonical” proteotypic peptides. *Proteomics*, 12(8), 1217–1221. <https://doi.org/10.1002/pmic.201100538>
- Ji, Z., Tan, M., Gao, Y., Zhang, J., Gong, X., Guo, G., & Lin, H. (2014). CRMP-5 interacts with tubulin to promote growth cone development in neurons. *International Journal of Clinical and Experimental Medicine*, 7(1), 67–75.
- Jiang, T., Zhang, G., Liang, Y., Cai, Z., Liang, Z., Lin, H., & Tan, M. (2020). PlexinA3 Interacts with CRMP2 to Mediate Sema3A Signalling During Dendritic Growth in Cultured Cerebellar Granule Neurons. *Neuroscience*, 434, 83–92. <https://doi.org/10.1016/j.neuroscience.2020.02.008>

- Khazaei, Mohamad R, Girouard, M.-P., Alchini, R., Ong Tone, S., Shimada, T., Bechstedt, S., ... Fournier, A. E. (2014). Collapsin Response Mediator Protein 4 Regulates Growth Cone Dynamics through the Actin and Microtubule Cytoskeleton. *The Journal of Biological Chemistry*, 289(43), 30133–30143. <https://doi.org/10.1074/jbc.M114.570440>
- Khazaei, Mohammad R, Montcalm, S., Di Polo, A., Fournier, A. E., Durocher, Y., & Tone, S. O. (2014). Development of a Cell Permeable Competitive Antagonist of RhoA and CRMP4 binding, TAT-C4RIP, to Promote Neurite Outgrowth. *Journal of Molecular Neuroscience : MN*. <https://doi.org/10.1007/s12031-014-0350-3>
- Kilsdonk, E. P. C., Yancey, P. G., Stoudt, G. W., Bangerter, F. W., Johnson, W. J., Phillips, M. C., & Rothblat, G. H. (1995). Cellular cholesterol efflux mediated by cyclodextrins. *Journal of Biological Chemistry*, 270(29), 17250–17256. <https://doi.org/10.1074/jbc.270.29.17250>
- Kimura, T., Watanabe, H., Iwamatsu, A., & Kaibuchi, K. (2005). Tubulin and CRMP-2 complex is transported via Kinesin-1. *Journal of Neurochemistry*, 93(6), 1371–1382. <https://doi.org/10.1111/j.1471-4159.2005.03063.x>
- Ko, M., Zou, K., Minagawa, H., Yu, W., Gong, J.-S., Yanagisawa, K., & Michikawa, M. (2005). Cholesterol-mediated neurite outgrowth is differently regulated between cortical and hippocampal neurons. *The Journal of Biological Chemistry*, 280(52), 42759–42765. <https://doi.org/10.1074/jbc.M509164200>
- Kolodkin, A. L., & Tessier-Lavigne, M. (2011). Mechanisms and molecules of neuronal wiring: a primer. *Cold Spring Harbor Perspectives in Biology*, 3(6). <https://doi.org/10.1101/cshperspect.a001727>
- Koshiyama, D., Fukunaga, M., Okada, N., Morita, K., Nemoto, K., Usui, K., ... COCORO. (2020). White matter microstructural alterations across four major psychiatric disorders: mega-analysis study in 2937 individuals. *Molecular Psychiatry*, 25(4), 883–895. <https://doi.org/10.1038/s41380-019-0553-7>
- Lamallice, L., Houle, F., & Huot, J. (2006). Phosphorylation of Tyr1214 within VEGFR-2 triggers the recruitment of Nck and activation of Fyn leading to SAPK2/p38 activation and endothelial cell migration in response to VEGF. *The Journal of Biological Chemistry*, 281(45), 34009–34020. <https://doi.org/10.1074/jbc.M603928200>
- Leung, T., Ng, Y., Cheong, A., Ng, C. H., Tan, I., Hall, C., & Lim, L. (2002). p80 ROK α binding protein is a novel splice variant of CRMP-1 which associates with CRMP-2 and modulates RhoA-induced neuronal morphology. *FEBS Letters*, 532(3), 445–449. [https://doi.org/10.1016/S0014-5793\(02\)03736-5](https://doi.org/10.1016/S0014-5793(02)03736-5)

- Li, Y., Xu, J., Wan, P., Yu, T., & Zhu, D. (2018). Optimization of GFP Fluorescence Preservation by a Modified uDISCO Clearing Protocol. *Frontiers in Neuroanatomy*, *12*, 67. <https://doi.org/10.3389/fnana.2018.00067>
- Lingwood, D., & Simons, K. (2010). Lipid Rafts As a Membrane-Organizing Principle. *Science (New York, N.Y.)*, 46–50. Retrieved from <http://science.sciencemag.org/>
- Moretti, S., Procopio, A., Lazzarini, R., Rippo, M. R., Testa, R., Marra, M., ... Catalano, A. (2008). Semaphorin3A signaling controls Fas (CD95)-mediated apoptosis by promoting Fas translocation into lipid rafts. *Blood*, *111*(4), 2290–2299. <https://doi.org/10.1182/blood-2007-06-096529>
- Niisato, E., Nagai, J., Yamashita, N., Abe, T., Kiyonari, H., Goshima, Y., & Ohshima, T. (2011). CRMP4 suppresses apical dendrite bifurcation of CA1 pyramidal neurons in the mouse hippocampus. *Developmental Neurobiology*, *72*(11), 1447–1457. <https://doi.org/10.1002/dneu.22007>
- Niisato, E., Nagai, J., Yamashita, N., Nakamura, F., Goshima, Y., & Ohshima, T. (2012). Phosphorylation of CRMP2 is involved in proper bifurcation of the apical dendrite of hippocampal CA1 pyramidal neurons. *Developmental Neurobiology*, *73*(2), 142–151. <https://doi.org/10.1002/dneu.22048>
- Nowrangi, M. A., & Rosenberg, P. B. (2015). The fornix in mild cognitive impairment and Alzheimer's disease. *Frontiers in Aging Neuroscience*, *7*, 1. <https://doi.org/10.3389/fnagi.2015.00001>
- Ohtsuka, H., Iguchi, T., Hayashi, M., Kaneda, M., Iida, K., Shimonaka, M., ... Kasahara, K. (2017). SDF-1 α /CXCR4 Signaling in Lipid Rafts Induces Platelet Aggregation via PI3 Kinase-Dependent Akt Phosphorylation. *PloS One*, *12*(1), e0169609. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0169609>
- Pan, C., Cai, R., Quacquarelli, F. P., Ghasemigharagoz, A., Loubopoulos, A., Matryba, P., ... Ertürk, A. (2016). Shrinkage-mediated imaging of entire organs and organisms using uDISCO. *Nature Methods*, *13*(10), 859–867. <https://doi.org/10.1038/nmeth.3964>
- Pirollet, F., Rauch, C. T., Job, D., & Margolis, R. L. (1989). Monoclonal antibody to microtubule-associated STOP protein: affinity purification of neuronal STOP activity and comparison of antigen with activity in neuronal and nonneuronal cell extracts. *Biochemistry*, *28*(2), 835–842. <https://doi.org/10.1021/bi00428a064>
- Quintremil, S., Alberti, C., Rivera, M., Medina, F., Puente, J., Cartier, L., ... Valenzuela, M. A. (2016). Tax and Semaphorin 4D Released from Lymphocytes Infected with Human Lymphotropic Virus Type 1 and Their Effect on Neurite Growth. *AIDS Research and*

- Human Retroviruses*, 32(1), 68–79. <https://doi.org/10.1089/aid.2015.0008>
- Raghu, H., Sodadasu, P. K., Malla, R. R., Gondi, C. S., Estes, N., & Rao, J. S. (2010). Localization of uPAR and MMP-9 in lipid rafts is critical for migration, invasion and angiogenesis in human breast cancer cells. *BMC Cancer*, 10, 647. <https://doi.org/10.1186/1471-2407-10-647>
- Raper, J., & Mason, C. (2017). Cellular Strategies of Axonal Pathfinding, 1–22. <https://doi.org/10.1101/cshperspect.a001933>
- Renier, N., Wu, Z., Simon, D. J., Yang, J., Ariel, P., & Tessier-lavigne, M. (2014). Resource iDISCO : A Simple , Rapid Method to Immunolabel Large Tissue Samples for Volume Imaging. *Cell*, 159(4), 896–910. <https://doi.org/10.1016/j.cell.2014.10.010>
- Rohm, B., Ottemeyer, A., Lohrum, M., & Püschel, A. W. (2000). Plexin/neuropilin complexes mediate repulsion by the axonal guidance signal semaphorin 3A. *Mechanisms of Development*, 93(1–2), 95–104. [https://doi.org/10.1016/s0925-4773\(00\)00269-0](https://doi.org/10.1016/s0925-4773(00)00269-0)
- Rosslenbroich, V., Dai, L., Franken, S., Gehrke, M., Junghans, U., Gieselmann, V., & Kappler, J. (2003). Subcellular localization of collapsin response mediator proteins to lipid rafts. *Biochemical and Biophysical Research Communications*, 305(2), 392–399. [https://doi.org/10.1016/s0006-291x\(03\)00754-x](https://doi.org/10.1016/s0006-291x(03)00754-x)
- Scheinman, E. J., Rostoker, R., & Leroith, D. (2013). Cholesterol affects gene expression of the Jun family in colon carcinoma cells using different signaling pathways. *Molecular and Cellular Endocrinology*, 374(1–2), 101–107. <https://doi.org/10.1016/j.mce.2013.04.011>
- Schindelin, J., Arganda-Carreras, I., Frise, E., Kaynig, V., Longair, M., Pietzsch, T., ... Cardona, A. (2012). Fiji: an open-source platform for biological-image analysis. *Nature Methods*, 9(7), 676–682. <https://doi.org/10.1038/nmeth.2019>
- Schmidt, E. F., Shim, S.-O., & Strittmatter, S. M. (2008). Release of MICAL autoinhibition by semaphorin-plexin signaling promotes interaction with collapsin response mediator protein. *The Journal of Neuroscience: The Official Journal of the Society for Neuroscience*, 28(9), 2287–2297. <https://doi.org/10.1523/JNEUROSCI.5646-07.2008>
- Schmued, L., Bowyer, J., Cozart, M., Heard, D., Binienda, Z., & Paule, M. (2008). Introducing Black-Gold II, a highly soluble gold phosphate complex with several unique advantages for the histochemical localization of myelin. *Brain Research*, 1229, 210–217. <https://doi.org/10.1016/j.brainres.2008.06.129>
- Sekine, Y., Algarate, P. T., Cafferty, W. B. J., Stephen, X., & Strittmatter, M. (2019). Development/Plasticity/Repair Plexina2 and CRMP2 Signaling Complex Is Activated by Nogo-A-Liganded Ngr1 to Restrict Corticospinal Axon Sprouting after Trauma.

<https://doi.org/10.1523/JNEUROSCI.2996-18.2019>

- Simons, K., & Sampaio, J. L. (2011). Membrane organization and lipid rafts. *Cold Spring Harbor Perspectives in Biology*, 3(10), a004697. <https://doi.org/10.1101/cshperspect.a004697>
- Sui, Z., Kovács, A. D., & Maggirwar, S. B. (2006). Recruitment of active glycogen synthase kinase-3 into neuronal lipid rafts. *Biochemical and Biophysical Research Communications*, 345(4), 1643–1648. <https://doi.org/10.1016/j.bbrc.2006.05.087>
- Takaya, R., Nagai, J., Piao, W., Niisato, E., Nakabayashi, T., Yamazaki, Y., ... Ohshima, T. (2016). CRMP1 and CRMP4 are required for proper orientation of dendrites of cerebral pyramidal neurons in the developing mouse brain. *Brain Research*, (February), 0–1. <https://doi.org/10.1016/j.brainres.2016.11.003>
- Tan, M., Cha, C., Ye, Y., Zhang, J., Li, S., Wu, F., ... Guo, G. (2015). CRMP4 and CRMP2 interact to coordinate cytoskeleton dynamics, regulating growth cone development and axon elongation. *Neural Plasticity*, 2015. <https://doi.org/10.1155/2015/947423>
- Tanaka, H., Morimura, R., & Ohshima, T. (2012). Dpysl2 (CRMP2) and Dpysl3 (CRMP4) phosphorylation by Cdk5 and DYRK2 is required for proper positioning of Rohon-Beard neurons and neural crest cells during neurulation in zebrafish. *Developmental Biology*, 370(2), 223–236. <https://doi.org/10.1016/j.ydbio.2012.07.032>
- Tanaka, H., Nojima, Y., Shoji, W., Sato, M., Nakayama, R., Ohshima, T., & Okamoto, H. (2011). Islet1 selectively promotes peripheral axon outgrowth in Rohon-Beard primary sensory neurons. *Developmental Dynamics*, 240(1), 9–22. <https://doi.org/10.1002/dvdy.22499>
- Tsuboi, D., Hikita, T., Qadota, H., Amano, M., & Kaibuchi, K. (2005). Regulatory machinery of UNC-33 Ce-CRMP localization in neurites during neuronal development in *Caenorhabditis elegans*. *Journal of Neurochemistry*, 95(6), 1629–1641. <https://doi.org/10.1111/j.1471-4159.2005.03490.x>
- Tsutiya, A., Nakano, Y., Hansen-Kiss, E., Kelly, B., Nishihara, M., Goshima, Y., ... Ohtani-Kaneko, R. (2017). Human CRMP4 mutation and disrupted Crmp4 expression in mice are associated with ASD characteristics and sexual dimorphism. *Scientific Reports*, 7(1), 16812. <https://doi.org/10.1038/s41598-017-16782-8>
- Tsutiya, A., Watanabe, H., Nakano, Y., Nishihara, M., Goshima, Y., & Ohtani-Kaneko, R. (2016). Deletion of collapsin response mediator protein 4 results in abnormal layer thickness and elongation of mitral cell apical dendrites in the neonatal olfactory bulb. *Journal of Anatomy*, (November 2015), n/a--n/a. <https://doi.org/10.1111/joa.12434>

- Uchida, Y., Ohshima, T., Sasaki, Y., Suzuki, H., Yanai, S., Yamashita, N., ... Goshima, Y. (2005). Semaphorin3A signalling is mediated via sequential Cdk5 and GSK3B phosphorylation of CRMP2: Implication of common phosphorylating mechanism underlying axon guidance and Alzheimer's disease. *Genes to Cells*, *10*(2), 165–179. <https://doi.org/10.1111/j.1365-2443.2005.00827.x>
- Uchida, Y., Ohshima, T., Yamashita, N., Ogawara, M., Sasaki, Y., Nakamura, F., & Goshima, Y. (2009). Semaphorin3A signaling mediated by fyn-dependent tyrosine phosphorylation of collapsin response mediator protein 2 at tyrosine 32. *Journal of Biological Chemistry*, *284*(40), 27393–27401. <https://doi.org/10.1074/jbc.M109.000240>
- Whitehead, S. N., Gangaraju, S., Slinn, J., & Hou, S. T. (2010). Transient and bilateral increase in Neuropilin-1, Fer kinase and collapsin response mediator proteins within membrane rafts following unilateral occlusion of the middle cerebral artery in mouse. *Brain Research*, *1344*, 209–216. <https://doi.org/10.1016/j.brainres.2010.05.036>
- Witter, M. P. (2006). Connections of the subiculum of the rat: Topography in relation to columnar and laminar organization. *Behavioural Brain Research*, *174*(2), 251–264. <https://doi.org/10.1016/j.bbr.2006.06.022>
- Yamashita, N., Morita, A., Uchida, Y., Nakamura, F., Usui, H., Ohshima, T., ... Goshima, Y. (2007). Regulation of Spine Development by Semaphorin3A through Cyclin-Dependent Kinase 5 Phosphorylation of Collapsin Response Mediator Protein 1. *Journal of Neuroscience*, *27*(46), 12546–12554. <https://doi.org/10.1523/JNEUROSCI.3463-07.2007>
- Yamazaki, Y., Nagai, J., Akinaga, S., Koga, Y., Hasegawa, M., Takahashi, M., ... Ohshima, T. (2020). Phosphorylation of CRMP2 is required for migration and positioning of Purkinje cells: Redundant roles of CRMP1 and CRMP4. *Brain Research*, *1736*, 146762. <https://doi.org/10.1016/j.brainres.2020.146762>

Figure legends

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

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

B: Coomassie gel of pull-down experiments. Control Sepharose beads (control lane) or CNBr-coupled CRMPs-Sepharose beads were incubated with purified MAP6-N-His protein. Input lane corresponds to the total amount of MAP6-N-His (2 μ g) incubated with the CRMPs-Sepharose beads (5 μ L). Molecular weights are indicated in kDa.

Figure 1 – figure supplement 1 : Recombinant CRMP proteins

Coomassie blue staining of purified recombinant CRMPs (2 μ g for each sample).

Figure 2: Effect of CRMP down-regulation on Sema3E growth-promoting activity

A: Western blot of crude extracts from cultured subicular neurons treated for 48 h with siRNA for CRMPs or control siRNA, and blotted with CRMP and GAPDH antibodies. Right panel: quantification of siRNA efficiency, values are expressed as percent inhibition compared to control siRNA (n = 3 independent experiments).

B: Axonal length measured in cultured subicular neurons treated for 48 h with control siRNAs and CRMP siRNAs (20 nM). Values were normalized to 100% for control siRNAs.

C: Representative images of subicular neurons electroporated with control or CRMP4 siRNA and cultured in the absence (AP-Ctrl) or presence of 5 nM Sema3E (AP-Sema3E) for 48 h. To measure axonal length, neurons were immunolabeled with anti- α -tubulin. Scale bar, 100 μ m.

D: Quantification of the relative axonal length of cultured subicular neurons treated for 48 h with 20 nM of control or CRMP siRNAs in the absence (AP-Ctrl) or presence of 5 nM Sema3E (AP-Sema3E). Values were normalized to 100% for the AP control condition (AP-Ctrl).

E: Quantification of relative axonal length in cultured WT and CRMP4-KO subicular neurons. Values were normalized to 100% for WT neurons.

F: Quantification of the relative axonal length of cultured WT and CRMP4-KO subicular neurons in the absence (AP-Ctrl) or presence of 5 nM Sema3E (AP-Sema3E). Values were normalized to 100% for the AP control (AP-Ctrl) condition.

G: Quantification of the relative axonal length of cultured CRMP4-KO subicular neurons electroporated with control plasmid coding for eGFP or for eGFP-tagged CRMP4 in the

absence (AP-Ctrl) or presence of 5 nM Sema3E (AP-Sema3E). Values were normalized to 100% for the AP control condition.

In B, D, E, F and G, crosses represent the mean, black bars represent the median, boxes represent the 25th and 75th percentiles, and the whiskers represent the 5th and 95th percentiles of values (75 neurons for each condition) from three independent cultures. Kruskal-Wallis non-parametric test followed by Dunn's multiple comparisons, **** $p < 0.0001$, *** $p < 0.001$, ** $p < 0.01$, * $p < 0.05$ and n.s $p > 0.05$.

Figure 3 with 1 supplement: CRMP4 expression in subicular neurons and fornix projections

A: Coronal sections of E17.5 WT (columns a, c, d) and CRMP4-KO (columns b, e) brain were immunolabeled with anti-CRMP4 and anti-Nrp1 antibodies. White squares (columns a and b) indicate the positions of fields of view shown in columns c-e.

Abbreviations: ac: anterior commissure, fi: fimbria; pf: post-commissural fornix. Scale bars, 100 μm .

B: Cultured subicular neurons at 2 DIV were immunolabeled with anti-CRMP4 and anti-Nrp1 antibodies. The conventional confocal plane shows the entire neuron. Images from the confocal Airyscan detail the growth cone on two serial acquisition planes. Scale bars, 10 μm .

Figure 4: Effect of CRMP4-KO on post-commissural fornix formation.

A: From left to right: The sagittal diagram shows the projection stacks for the post-commissural fornix (pf; red) and mammillo-thalamic tract (mt, purple); the green line indicates the level of the coronal section. Representative coronal section corresponding to the onset of the anterior part of the anterior hypothalamic area (AHA) in P0 WT and CRMP4-KO brains immunolabeled with anti-Nrp1 antibody. Fornix and mammillo-thalamic tract were squared.. Scale bar, 1 mm. Higher-magnification images show representative post-commissural and mammillo-thalamic tracts in CRMP4-KO and WT brains after Nrp1 immunolabeling. Scale bars, 100 μm . Dot plots show quantifications of both fornix and mammillo-thalamic tract diameters. Mean \pm *s.e.m.* WT $n = 6$, KO $n = 5$, Mann-Whitney test, * $p < 0.001$.

B: From left to right: The coronal diagram shows the projection stack of post-commissural fornix (red) on a coronal plane. The green line indicates the plane of the sagittal sections. Representative sagittal sections with a cutting angle of 30° for P0 WT and CRMP4-KO brains were immunolabeled with anti-Nrp1 antibody. The lengths of post-commissural fornices were

measured using ImageJ, taking the anterior commissure as the starting point. All traces measured from WT (n = 5; red) and CRMP4-KO (n = 6; green) were superimposed and are shown in the right panel. The dot plot shows quantifications of post-commissural fornices. Scale bar, 250 μm . Mean \pm *s.e.m.* Mann-Whitney test, * $p < 0.05$.

C: The sagittal diagram shows the projection stack of the post-commissural fornix (pf, in red) and black lanes indicate the segmented portion of the fornix. The anterior commissure (ac, in orange) was used as the starting point to segment the fornix (upper left diagram). A representative P2 segmented fornix is shown in 3D reconstruction (Nrp1 in red) in the whole brain (autofluorescence in grey), illustrated in lateral view and ventral view (upper right panel). Reconstructions were produced using the ImageJ 3D Viewer plugin. Scale bar, 1 mm. Representative ventral z projections of WT and CRMP4-KO fornices at E18.5, P0, and P2 are presented (bottom left panels). The fluorescence intensity of the segmented fornix is represented by a red-to-white color scale. White arrowheads point to axon bundles splitting off from the fornix. Scale bar, 500 μm . Histogram shows quantifications of the segmented post-commissural fornix volume at E18.5 (WT = 3; KO = 2), P0 (WT = 4, KO = 5) and P2 (WT = 3; KO = 2) for WT and CRMP4-KO mice. Bars indicate the mean volume \pm *s.e.m.* Kruskal-Wallis non-parametric test followed by Dunn's multiple comparisons and one-way ANOVA to compare WT vs KO, * $p < 0.05$, ** $p < 0.01$.

Figure 5 with 2 supplements: Deletion of CRMP4 affects fornix integrity in the adult brain.

A: Schematic representation of the fornix tract (red region) on a sagittal diagram. Grey lines indicate the Bregma positions, in mm, of the coronal planes presented in B, C, and D.

B-D: Coronal brain sections from adult WT and CRMP4-KO brains were stained with gold chloride. Diagrams of adult brain coronal slices illustrating the anatomical levels selected to measure surfaces covered by the fornix (pf) and mammillo-thalamic tract (mt). Square in the diagrams indicate the regions shown on the coronal sections stained with gold chloride. Histograms show quantifications of fibers areas and fasciculation index, mean \pm *s.e.m.* WT = 5, KO = 4. Mann-Whitney test, * $p < 0.05$. Scale bar, 250 μm .

Abbreviations: HF: hippocampal formation, MB: mammillary body; AH: anterior hypothalamus; SPT: septum; pre-f: pre-commissural fornix; pf: post-commissural fornix; mt: mammillo-thalamic tract; mcht, medial cortico-hypothalamic tract and ac: anterior commissure, S: subiculum.

Figure 5 –figure supplement 1: Comparison of the number of subicular neurons in WT and CRMP4 dorsal subicula.

Coronal sections of the subiculum from adult WT and CRMP4-KO animals expressing the reporter eYFP in the subiculum. The dorsal subiculum shown in the diagram of Bregma -2.80 mm section (A) was delimited on the NeuN immunolabeling slice (B, dashed ROI). The density of eYFP-stained subicular neurons in WT and CRMP4-KO dorsal subicula was quantified, and the results are shown in (C). Difference between genotypes were not significant (n = 4 animals for each genotype).

Figure 5-figure supplement 2: Visualization of the whole fornix system by uDISCO tissue clearing.

A: Adult half-brains from WT- and CRMP4-KO-Thy1-eYFP-H mice were cleared by a hybrid uDISCO method (see Material and Methods section). Representative broad panoramic views of z projections of WT and CRMP4-KO are shown. White squares indicate regions shown in B. Scale bar, 1 mm. Voxel size, x = 2.07, y = 2.07, z = 5.77 μm .

B: Higher magnifications of z projections show post-commissural fornix fibers (pf) entering mammillary bodies (MB) and mcht fibers emerging from the fornix. Arrows and arrowheads indicate the mcht fibers emerging from the anterior and posterior sides, respectively, of the anterior commissure (ac). Scale bar, 200 μm .

Abbreviations: HF: hippocampal formation, MB: mammillary body; S: subiculum, SPT: septum; ac: anterior commissure, mcht: medial cortico-hypothalamic tract, pf: post-commissural fornix and pre-f: pre-commissural fornix.

Figure 6: Post-commissural fornices are affected in CRMP4^{+/-}/Sema3E^{+/-} double heterozygotes.

A: P0 segmented fornices (red) and mammillo-thalamic tracts (blue) 3D reconstructions in whole-brains are illustrated in lateral view (left panel) and ventral view (right panel). Whole-brains from single and double heterozygotes for CRMP4 and Sema3E and their WT littermates at P0 were immunolabeled with Nrp1 antibody and cleared according to the iDISCO protocol. Fornices and mammillo-thalamic fiber bundles were segmented using Imaris software.

B: Quantification of fornix (left panel) and mammillo-thalamic tract (right panel) volumes in P0 brains from WT (n = 11), CRMP4^{+/-} (n = 9), Sema3E^{+/-} (n = 7), and CRMP4^{+/-}/Sema3E^{+/-} (n = 8) mice. Voxel size: x = 3.02; y = 3.02; z = 3 μm ; Bars indicate the mean volume \pm *s.e.m.* Kruskal-Wallis non-parametric test followed by Dunn's multiple comparisons, ***p* < 0.01, ns *p* > 0.05.

Figure 7: CRMP4 forms complexes with Sema3E receptors.

A: Western blot showing co-immunoprecipitation of CRMP4 and Sema3E receptors. HEK293T/17 cells were transfected with plasmids encoding CRMP4-tGFP, VEGFR2-FLAG, VSV-PlxD1, and FLAG-Nrp1 proteins. Cells were lysed in buffer containing 0.5% Triton X-100, and immunoprecipitation was performed using a polyclonal anti-VEGFR2 antibody.

B-D: Western blot showing co-immunoprecipitation of CRMP4 with each individual Sema3E receptor. HEK293T/17 cells were transfected with plasmids encoding CRMP4-tGFP and with plasmids encoding VEGFR2-FLAG (B), VSV-PlxD1 (C), or FLAG-Nrp1 (D). Cells were lysed in buffer containing 0.5% Triton X-100 and immunoprecipitation was performed using a polyclonal anti-tGFP antibody.

Figure 8: CRMP4 interacts with the Sema3E receptor complex in Detergent-Resistant Membrane fractions

A: HEK293T/17 cells were transfected with plasmids encoding CRMP4-tGFP, VSV-PlxD1, and FLAG-Nrp1 proteins. Cells were lysed in buffer containing 0.5% Triton X-100 (as used in Figure 7) or 1% Triton X-100. Immunoprecipitations were performed using a polyclonal anti-tGFP antibody. Proteins were analyzed by western blotting with PlxD1, Nrp1, and tGFP antibodies.

B and C: Sucrose-density gradient fractionation of lysates prepared with 1% Triton X-100 from HEK293T/17 cells transfected with plasmids encoding ectopic CRMP4-tGFP, VSV-PlxD1, and FLAG-Nrp1 proteins. HEK293T/17 cells were cultured in the absence (B) or presence (C) of 10 mM methyl-beta-cyclodextrin (M β CD) for 7 h. Fractions were then analyzed by western blot. Ectopic proteins were assayed with PlxD1, Nrp1, and tGFP antibodies, and endogenous flotillin was detected with flotillin antibodies.

D: Western blot showing co-immunoprecipitations between CRMP4 and the Sema3E receptor complex from sucrose gradient fractions corresponding to DRM (3, 4, and 5) or to the RPM (10, 11 and 12 see left panel in A), using a polyclonal anti-tGFP antibody. In control conditions (Ctrl), no tGFP antibody was added to the pooled fractions. Equivalent volumes of pooled fraction (DRM and RPM) were loaded (input).

Figure 9: Methyl-beta-cyclodextrin inhibits the downstream Sema3E signaling pathway

A: Representative images of WT subicular neurons cultured in the absence (AP-Ctrl) or presence of 5 nM Sema3E (AP-Sema3E) for 48 h, with or without M β CD pretreatment

(1.5 mM). Cells were fixed and stained with an anti-tubulin antibody to visualize neuronal extensions. Scale bar 100 μ m

B: Quantification of relative axonal lengths in WT subicular neurons cultured in the absence (AP-Ctrl) or presence of 5 nM recombinant Sema3E (AP-Sema3E) for 48 h, following a 2-h pretreatment with different M β CD concentrations (from 0 to 1.5 mM). Crosses represent the mean, black bars represent the median, boxes represent the 25th and 75th percentiles, and the whiskers represent the 5th and 95th percentiles of values (300 neurons for each condition from two independent cultures). Values were normalized to 100% for control conditions (AP-Ctrl). Kruskal-Wallis non-parametric test followed by Dunn's multiple comparisons, **** $p < 0.0001$ and n.s. $p > 0.05$.

C: Representative western blots of subicular neurons exposed or not to 4 mM M β CD for 30 min, followed or not with 5 nM recombinant Sema3E for 8 min. Proteins and phosphorylated proteins were assessed using their corresponding antibodies. $n = 2$ independent experiments, samples were loaded in duplicate.

Figure 9- figure supplement 1: Effect of M β CD on axonal growth of subicular neurons.

Figure 10: The cytoskeleton-binding domain of CRMP4 is required for Sema3E growth-promoting activity

A: Schematic representations of tGFP- or eGFP-tagged CRMP4 proteins used for rescue experiments in subicular neurons. Cytoskeleton-binding domain (grey rectangle) and the positions of the GSK3 β (yellow stripes) and Cdk5/DYRK2 (green stripes) phosphorylation sites are indicated.

B: Quantification of the relative axonal length in CRMP4-KO subicular neurons electroporated with plasmids encoding tGFP, CRMP4-tGFP, CRMP4-tGFP non-phosphorylatable mutant (CRMP4-4A-tGFP), or CRMP4-tGFP phospho-mimetic mutant (CRMP4-4D-tGFP), in the absence (AP-Ctrl) or presence of 5 nM Sema3E (AP-Sema3E). Expression levels of each CRMP protein (lower panels).

C: Axonal lengths measured for cultured CRMP4-KO subicular neurons electroporated with plasmids encoding eGFP, CRMP4-eGFP, or CRMP4-eGFP mutant lacking the cytoskeleton-binding domain (CRMP4 Δ Cyt-eGFP), in the absence (AP-Ctrl) or presence of 5 nM Sema3E (AP-Sema3E). Expression levels for each CRMP protein (lower panels).

In B and C, crosses represent the mean, black bars represent the median, boxes represent the 25th and 75th percentiles, and whiskers represent the 5th and 95th percentiles of values from two

independent cultures (B) or three independent cultures (C). Neurons (n=300 per condition) were randomly selected; for one of the three KO-EGFP CtrlL cultures, only 277 neurons could be selected. Values were normalized to 100% for values obtained in control conditions (AP-CtrlL). Kruskal-Wallis non-parametric test followed by Dunn's multiple comparisons, **** $p < 0.0001$ and n.s. $p > 0.05$.

Article 2

AutoNeuriteJ: An ImageJ plugin for measurement and classification of neuritic extensions

Benoit Boulan, Anne Beghin, Charlotte Ravanello, Jean-Christophe
Deloulme, Sylvie Gory-Faure, Annie Andrieux, Jacques Brocard, Eric Denarier

PLOS ONE 2020 DOI : [10.1371/journal.pone.0234529](https://doi.org/10.1371/journal.pone.0234529)

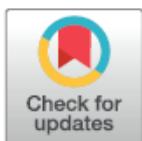
Résumé de l'article

La caractérisation des mécanismes participants à l'établissement de la connectivité neuronale, et entre autres ceux régulant la croissance axonale comme celle que nous avons réalisée pour déterminer le rôle de CRMP4 dans la mise en place du fornix, requièrent une analyse morphologique des neurones. Ce type d'étude peut s'avérer fastidieuse car elle nécessite, pour obtenir des résultats probants, la classification et la mesure de neurites provenant d'un nombre de neurones en culture important. L'équipe dans laquelle j'ai effectué ma thèse a développé une macro « AutoNeuriteJ » fonctionnant sur le logiciel Fiji et permettant de quantifier différents paramètres morphologiques du neurone. Cette macro fonctionne à partir d'images de culture de neurones présentant un contraste de fluorescence important ainsi qu'un marquage spécifique du noyau et pouvant être acquises avec un microscope de type scanner de lames utilisant un objectif X20 ou X10. AutoNeuriteJ s'articule en trois parties. La première consiste en la binarisation des images et l'élimination des débris cellulaires (Figure x). La deuxième partie de la macro génère une image individuelle pour chaque neurone sur laquelle ne sera gardé que son « squelette » ainsi que son corps cellulaire créé à partir d'une dilatation du noyau dans l'image du neurone binarisée. Les neurones présentant plus d'un noyau sont éliminés et une taille minimale de neurites est fixée pour exclure les neurones indifférenciés. Enfin la dernière partie de la macro classe les neurites suivant les critères « primaire » (partant du corps cellulaire), « secondaire » (partant d'un neurite primaire) etc. Le neurite le plus long est identifié et il est considéré comme étant un axone en vertu de certains critères qu'il est possible de paramétrer au préalable (une taille minimale et l'écart de taille requis par rapport au deuxième neurite le plus long). Un code couleur est attribué à chaque neurite en fonction des critères de classement qui viennent d'être cités et un fichier regroupant pour chaque neurones la taille de tous les neurites ainsi que leur classification est généré. Ce fichier pourra ensuite être utilisé pour réaliser différentes mesures statistiques. La mise au point d'AutoNeuriteJ a nécessité de la faire fonctionner sur des images obtenues à partir de conditions de cultures connues pour favoriser par exemple la longueur des axones ou le nombre de neurites primaires. Pour cela, différentes expériences, auxquelles j'ai pris part, ont été réalisées à partir de cultures de neurones d'hippocampe ou de subiculum. Elles ont permis de montrer qu'AutoNeuriteJ est un outil permettant de faciliter la détection de l'effet d'un traitement par des molécules, comme le nocodazole ou la sémaphorine 3E, spécifiquement sur les dendrites ou sur les axones et à différents stades de développement. Cette macro est également capable de mettre en évidence des altérations morphologiques dans des neurones issus de souris mutantes comme la souris

MAP6 KO utilisée dans cette étude. Enfin, l'avantage majeur de l'utilisation de cette macro est la capacité d'analyse d'un grand nombre de neurones de manière automatique sans biais de l'utilisateur. AutoNeuriteJ a été utilisée pour mesurer la croissance axonale dans la grande majorité des cultures de neurones que nous avons réalisées dans notre article *CRMP4 mediates fornix development through semaphorin-3E signaling pathway*.

RESEARCH ARTICLE

AutoNeuriteJ: An ImageJ plugin for measurement and classification of neuritic extensions

Benoit Boulan¹[✉], Anne Beghin², Charlotte Ravello¹, Jean-Christophe Deloume¹, Sylvie Gory-Fauré¹, Annie Andrieux¹, Jacques Brocard¹[✉], Eric Denarier¹^{*}¹ Univ. Grenoble Alpes, Inserm U1216, CEA, Grenoble Institut Neurosciences, Grenoble, France,² MechanoBiology Institute (MBI) at NUS Singapore MBI, T-Lab, Singapore[✉] Current address: Cellular Neurobiology Research Unit, Institut de recherches cliniques de Montréal (IRC), Montreal, Canada[✉] Current address: PLATIM, ENS de Lyon, US8/INSERM, Lyon, France* eric.denarier@univ-grenoble-alpes.fr

Abstract

Morphometry characterization is an important procedure in describing neuronal cultures and identifying phenotypic differences. This task usually requires labor-intensive measurements and the classification of numerous neurites from large numbers of neurons in culture. To automate these measurements, we wrote AutoNeuriteJ, an imageJ/Fiji plugin that measures and classifies neurites from a very large number of neurons. We showed that AutoNeuriteJ is able to detect variations of neuritic growth induced by several compounds known to affect the neuronal growth. In these experiments measurement of more than 5000 mouse neurons per conditions was obtained within a few hours. Moreover, by analyzing mouse neurons deficient for the microtubule associated protein 6 (MAP6) and wild type neurons we illustrate that AutoNeuriteJ is capable to detect subtle phenotypic difference in axonal length. Overall the use of AutoNeuriteJ will provide rapid, unbiased and accurate measurement of neuron morphologies.

 OPEN ACCESS

Citation: Boulan B, Beghin A, Ravello C, Deloume J-C, Gory-Fauré S, Andrieux A, et al. (2020) AutoNeuriteJ: An ImageJ plugin for measurement and classification of neuritic extensions. *PLoS ONE* 15(7): e0234529. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0234529>

Editor: Giorgio F. Gilestro, Imperial College London, UNITED KINGDOM

Received: May 22, 2020

Accepted: June 29, 2020

Published: July 16, 2020

Peer Review History: PLOS recognizes the benefits of transparency in the peer review process; therefore, we enable the publication of all of the content of peer review and author responses alongside final, published articles. The editorial history of this article is available here: <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0234529>

Copyright: © 2020 Boulan et al. This is an open access article distributed under the terms of the [Creative Commons Attribution License](https://creativecommons.org/licenses/by/4.0/), which permits unrestricted use, distribution, and reproduction in any medium, provided the original author and source are credited.

Data Availability Statement: All relevant data are within the manuscript and its Supporting Information files.

Introduction

The study of neurodevelopmental or neurodegenerative diseases necessitates the production of mouse strains mutated in potentially disease-causing genes. To get a molecular understanding of the disease, it is classical to perform neuron cultures from these strains of mice and follow their development with the goal of revealing specific phenotypes [1]. Alternatively the effect of drugs or attractive molecules on the development of the neurons can be tested in culture [2, 3]. The early development of hippocampal neurons in culture undergoes three stages where a single round cell attaches, produces numerous growing extensions, and polarizes to differentiate one of its neurite into an axon (Fig 1) [4]. At the end of this early development, the neuron displays highly branched dendrites and axon. The description of the developmental timeline and final arborization complexity allows characterization of a morphological phenotype.

Funding: This work was supported by Institut National de la Santé et de la recherche Médicale, Commissariat à l'Energie Atomique et aux Energies Alternatives, Université Grenoble Alpes and by awards from the French Agence Nationale de la Recherche to A.A. (2017-CE11-0026 MAMAs). <https://www.inserm.fr/> <http://www.cea.fr/> <https://www.univ-grenoble-alpes.fr/> <https://anr.fr/>.

Competing interests: The authors have declared that no competing interests exist.

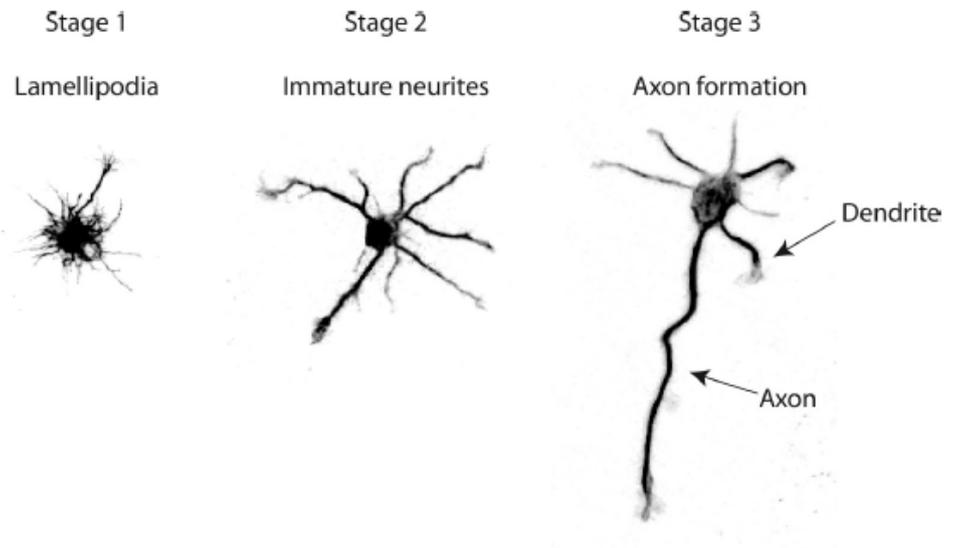


Fig 1. Stages of early development of hippocampal neurons in culture. Hippocampal neurons begin to form lamellipodia right after adhesion to the substrate (Stage 1). Few hours later the neurites sprouting begins (Stage 2). These protrusions undergo successive elongation and retraction phases with no net outgrowth. Eventually, one neurite acquires enhanced growth capabilities and becomes an axon (Stage 3).

<https://doi.org/10.1371/journal.pone.0234529.g001>

The morphometric description of cell cultures is tedious when done by hand, confining analysis to a number of cells that may not be representative of the whole neuronal culture. Moreover, visual selection of neurons by the investigator may lead to selection bias. The use of image analysis software should overcome these problems and several plugins have been developed to help in this task. Some of plugins are neuron-based, allowing for the semi-automatic tracing of neurite extension (e.g. NeuronJ) [5, 6], or population-based, where whole neuritic lengths are measured with no neuron individualization or neuritic assignment (axon, dendrite, order) [7–9], thus losing information of the number and classification of neurites. AutoNeuriteJ was created to characterize a neuronal population in culture on a cell-based basis, with large numbers of neurons analyzed allowing an accurate estimation of the whole distribution of the population.

Results

AutoNeuriteJ, a plugin set to measure and classify neuritic extensions

AutoNeuriteJ has been designed to describe the neuritic arborecence of isolated neurons in cultures of different conditions or genotypes. It gives, in a text file for each neuron, the length and order (primary, secondary; etc. . .) of each neurite. It also gives measurements of the axon length, number of branches and total axonal tree length, if any. At the end of the text file a summary indicates the number of neurons that have been measured, the percentage of polarization (neurons with an axon), the mean primary neurite length (neurite that initiate form the cell body) and mean primary neurite number per neuron.

AutoNeuriteJ can be used to process a single file or multiple large images obtained from mosaic images recorded from slide scanners (Fig 2A). For a better segmentation of thin cellular processes, AutoNeuriteJ requires well-contrasted images of fluorescent cells and images of nuclei stained with DAPI or Hoechst, used to locate cell bodies and remove touching neurons.

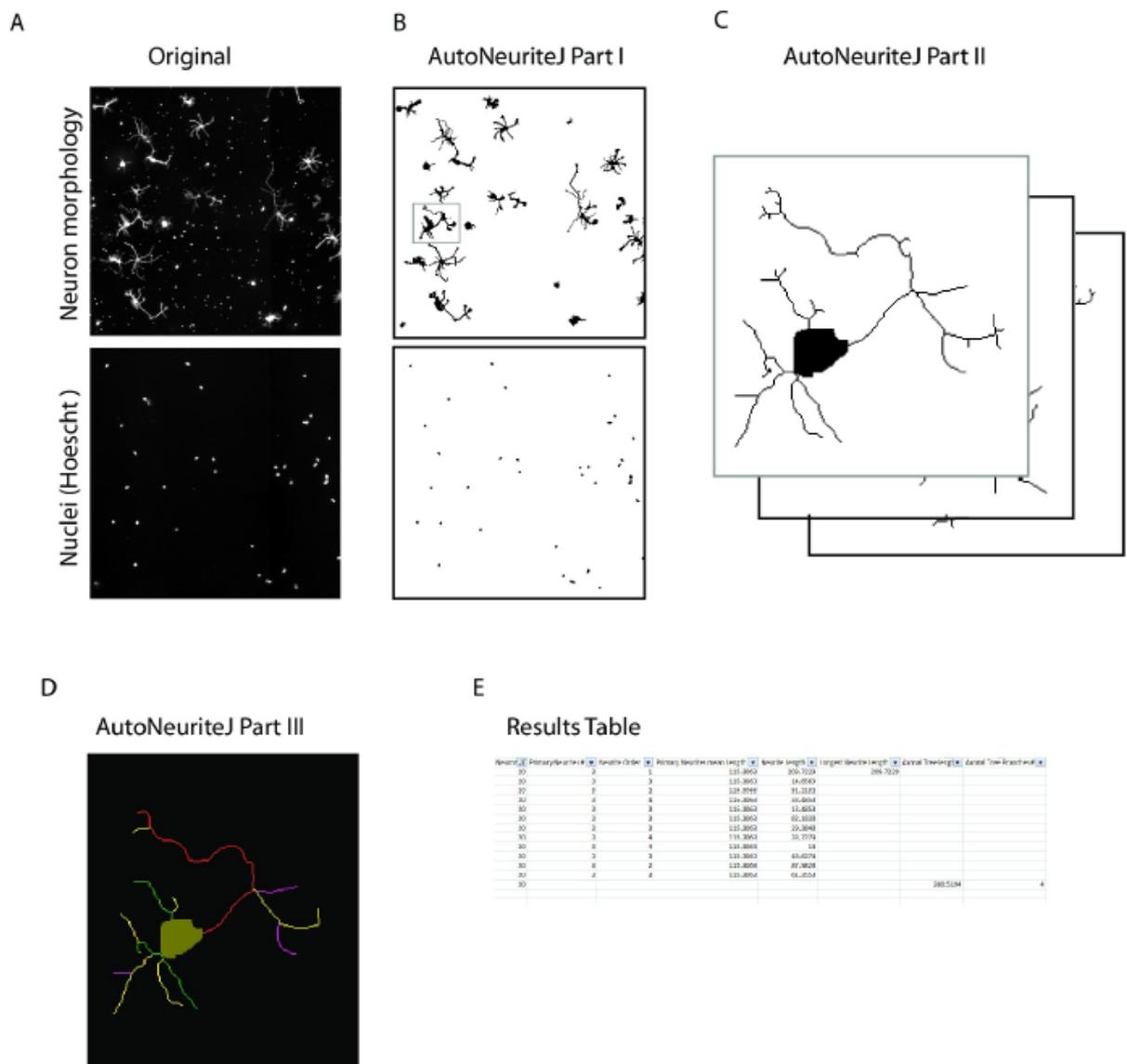


Fig 2. Schematic of AutoNeuriteJ images processing. (A) AutoNeuriteJ needs images of neuron (e.g. tubulin) and nuclei staining. (B) AutoNeuriteJ Part I segments nuclei and neurons, removes small particles. (C) AutoNeuriteJ part II selects individual neurons (with a single nucleus), creates cell body images and stacks of neurons. (D) AutoNeuriteJ part III detects neurite extremities, compares, classifies and measures neurites, prints results in a text file.

<https://doi.org/10.1371/journal.pone.0234529.g002>

The whole process is divided in three independent sub-macros to allow for a better flexibility and control of different parameters defined by the users.

Description of AutoNeuriteJ

Part I: Segmentation of neuron and nuclei. The first part of the macro allows the binarization of nuclei and neurons (Fig 2B). Images of neurons and nuclei are pre-processed for background homogenization and neurites enhancement. For the neuron images, a large blurred image is subtracted from a median-filtered image that removes noise. For the nuclei,

a difference of Gaussians adapted to the diameter of the nuclei is applied. Parameters to be defined are the mean diameter for nuclei and the minimal surface for a binarized neuron. These parameters are used to adapt the detection of nuclei and to remove smaller particles from the images. The parameters are saved in a text file and defined as default in the subsequent use of the macro. The segmentation is supervised by the user and binarized files are saved.

Part II: Creation of individual neuron images and skeletization. The second part of the macro allows the creation of single neuron images from the segmented images obtained in part I (Fig 2C). It selects the cells containing a single nucleus from the binarized neurons image and produces images of single neurons and their skeleton. A cell body is also created by limited dilatation of the nucleus into the binarized neuron image. Within the macro, a minimal length for neurite and neuritic tree is set to clean short branches that could be produced by the skeletonization step and to remove undifferentiated cells without neurites. Finally, the "Region of interest" set of the selected neurons on the original image is saved. The count of neurons selected or excluded (connected neurons and undifferentiated cells) is recorded in a text file.

Note that if different neurites of the same neuron cross, it will create a loop in the skeleton that prevents measuring their length. This difficulty is overcome in AutoNeuriteJ by cutting the branch of the loop at the location of the lowest intensity of staining, using the Analyze skeleton plugin [10].

Eventually, five different stacks are created: 1) Original neurons, 2) Binarized neurons 3) Cell Bodies 4) Skeletons of the binarized neurons 5) Skeletons and cell bodies. These different stacks will be used in the next step of the process.

Part III: Measurement and classification of neurites. The third part of the macro is used to measure and classify neuritic extensions (Fig 2D). Using the skeleton and body of neurons generated in Part II, neurite extremities are detected for each neuron using the "binary connectivity" plugin (Gabriel Landini's Morphology Plugins).

Each neurite is at first set as "primary" and its image is created. Secondly, each neurite is compared to all other neurites to detect potential overlaps. If an overlap is detected, the order of the shortest neurite is increased (from primary to secondary etc. . .) and the longest neurite image is subtracted to the shortest so that no overlaps exist. After this classification step, the length of each neurite is measured and the longest primary identified. The longest neurite will be considered as an axon if it satisfies to standard criteria [11], *i.e.* in our study the criteria were set to: the length of the axon should be twice the size of the second longest neurite and longer than 100 pixels. These parameters can be set by the user.

Finally, the macro produces an overlay for each neuron with the detected neurites colored according to their order (Fig 2D). A results text file is created presenting, for each neuron, the length and order of each neurite, the number of primary neurites, the length and number of branches of the axonal tree if any (Fig 2E). At the end of the process, a summary is printed giving the number of neuron measured, the percentage of neuron with an axon, mean and standard deviation of primary neurite length and of primary neurite number. This text file can be edited within a spreadsheet to organize the data and allow further statistical processing. Of note the stack of binarized neurons can be used to perform a classical Sholl analysis using the Fiji plugin (https://imagej.net/Sholl_Analysis).

AutoNeuriteJ validation

The measurements given by any automatic procedure first need to be validated by a classical method used in the field of expertise. We first compared the axonal length given by

AutoNeuriteJ and when measured semi-automatically using NeuronJ. We also compared the number of primary neurites detected by eye or by Sholl analysis to AutoNeuriteJ values. Finally, we applied several treatments known to change the morphology of neurons to verify that AutoNeuriteJ can detect these changes.

Measurement of axonal length. The most popular ImageJ plugin for neurite measurement is NeuronJ [5]. This plugin allows a semi-automatic tracing of neurite and needs a tedious work to get large numbers of measures. We used NeuronJ to measure the axonal length of mouse neurons. On the same images of polarized neurons we applied AutoNeuriteJ and compared the techniques by correlation analysis (Fig 3A). The correlation between values obtained by NeuronJ or AutoNeuriteJ is very strong ($r = 0.98$). By inspecting the data corresponding to points far above the fitted line we observed that they represent cells that have not been segmented correctly (e.g. Several cells are fused and present a single nucleus). These cells can be easily removed from the binarized stacks of neurons before the neurite measurement part of AutoNeuriteJ.

Primary neurite number. On the same images, we also compared the primary neurite number counted by eye and detected by the macro (Fig 3B). The average values are close (2.95 and 2.91 neurite per neuron by eye and using AutoNeuriteJ, respectively) and the correlation is strong ($r = 0.83$), with a slight underestimation by AutoNeuriteJ due to filtering minimal neuritic length. To further validate the accuracy of AutoNeuriteJ, we compared its measurements with those of the “Sholl analysis” plugin [12]. Among the different shape descriptors proposed by the Sholl analysis plugin, we extracted the number of primary branches inferred from the count of intersections at the starting radius close to the cell body. When comparing this number to the number of primary neurites detected by AutoNeuriteJ, we found a strong correlation ($r = 0.91$) (Fig 3C).

From these comparisons we concluded that AutoNeuriteJ gives a reliable mean to determine axonal length and primary neurites number.

Effect of nocodazole treatment on the major neurite length. It has been shown that nocodazole (a drug that depolymerizes microtubule at high concentration) used at low concentration, reduces the number and the length of neurites, specifically [13, 14]. Mouse neuron cultures were treated at day 1 with 50nM nocodazole, fixed and immunostained at 3 days in vitro (DIV). After AutoNeuriteJ quantification, we found that nocodazole treatment reduces the length of the longest neurite of unpolarized cells by 25% (Fig 4A) while the axons were resistant to nocodazole treatment (non-significant reduction of 4.7% when treated). This may reflect the fact that stable MT are enriched in axons as described by Witte *et al.* [15]. We also found that Nocodazole treatment reduces the number of primary neurites in unpolarized cells ($3.60 \pm 0.03 \mu\text{m}$ when treated vs $4.50 \pm 0.03 \mu\text{m}$ when untreated) or polarized cells ($2.72 \pm 0.12 \mu\text{m}$, when treated vs $3.75 \pm 0.11 \mu\text{m}$ when untreated) (Fig 4B).

From these results we concluded that, thanks to its ability to categorize the neuronal extensions, AutoNeuriteJ is a reliable tool to detect differential effects of a molecule on axons versus dendrites.

Effect of Semaphorin 3E. Semaphorin 3E (Sema3E) acts as a growth-promoting factor for axons of mice subicular neurons [16]. Thus we quantified Sema3E effect on subicular neurons. We first noticed the general effect of Sema3E treatment on subicular neurons polarity (10.6% of cells presenting an axon for control vs 33.9% for Sema3E treated condition). We then measure the major neuritic length. As expected, AutoNeuriteJ quantification showed an increased axonal length of polarized cells of 21.5% after 48h of treatment with Sema3E (Fig 5A). This effect is also detected on the longest neurite of unpolarized cells; with a 31.8% increase in Sema3E treated condition; revealing an early effect of Sema3E on neuritic growth. This observation at early stage can reflect either an effect on the major neurite whatever the differentiation stage of the neuron, or a global effect on all neurites of the neurons.

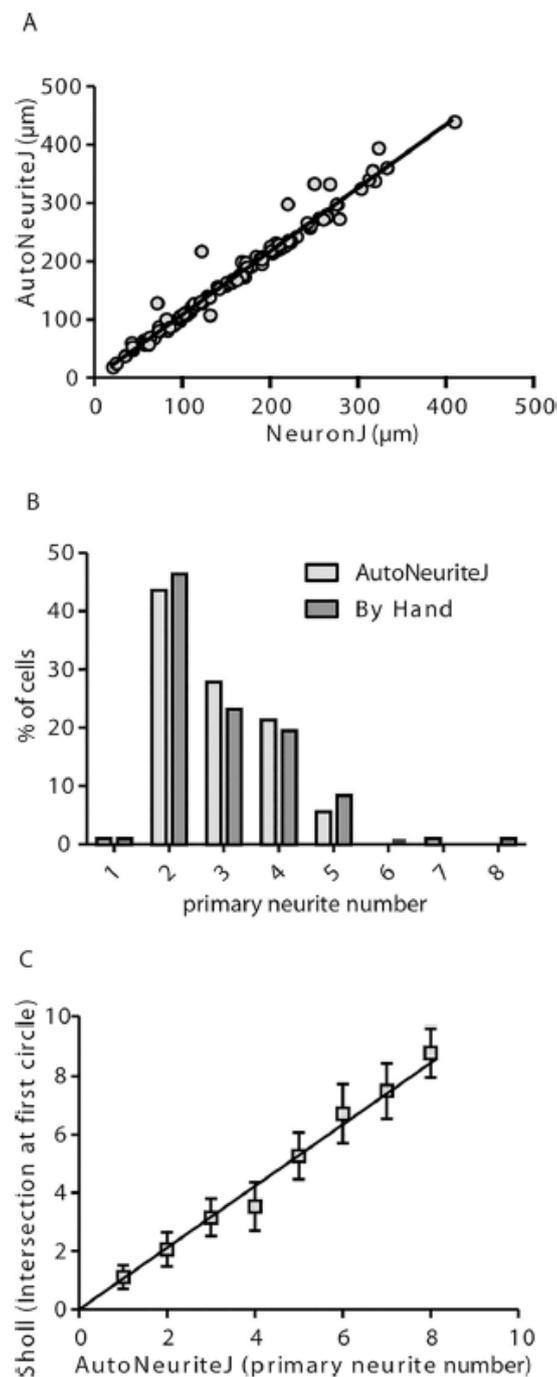


Fig 3. Validation of axonal length and number of primary neurite measurement. (A) Correlation of the measured axonal length using NeuronJ tracings or AutoNeuriteJ ($r = 0.98$ from linear regression) from 108 cells (B) Primary neurite numbers counted by hand or detected by AutoNeuriteJ ($r = 0.83$ from linear regression, $n = 108$). (C) Correlation of primary neurite number detected by AutoNeuriteJ and number of intersection at first circle detected by Sholl analysis ($r = 0.91$ from linear regression, $n = 2062$).

<https://doi.org/10.1371/journal.pone.0234529.g003>

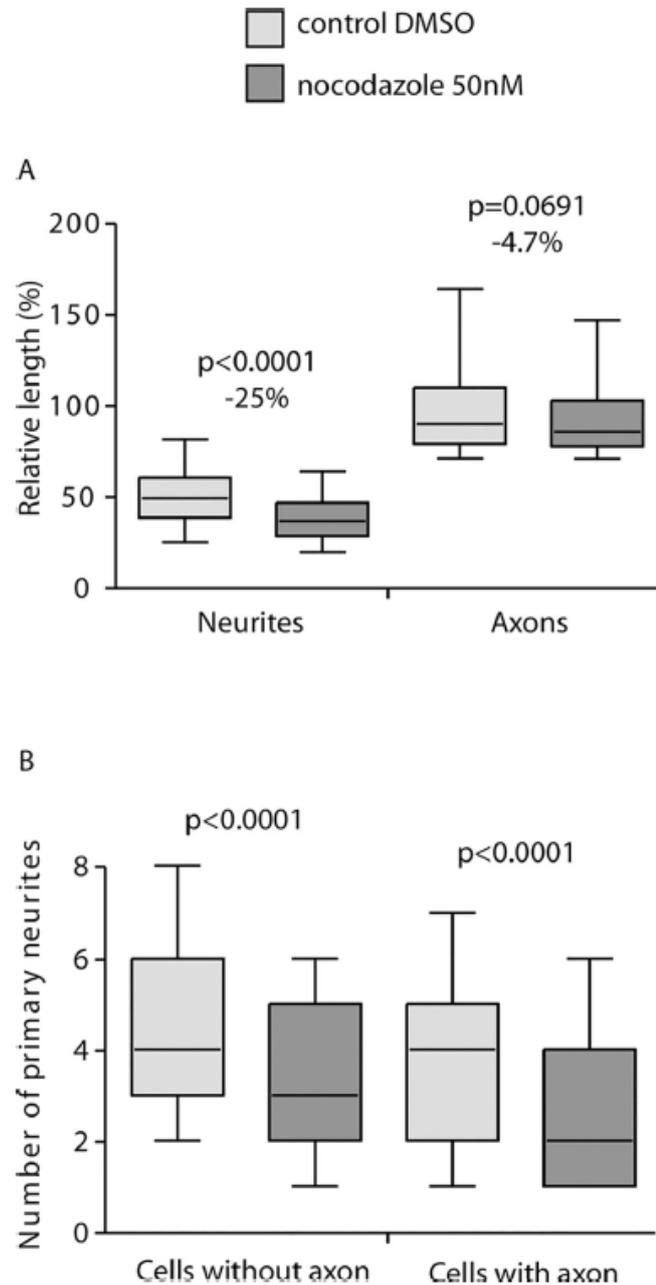


Fig 4. Effects of nocodazole treatment on the length of major neurites and primary neurite number. Mouse neurons in culture were treated with 50nM nocodazole 4h after plating. After 2DIV the neurons on coverslips were fixed and stained for tubulin and Hoescht before imaging and AutoNeuriteJ quantifications. (A) Nocodazole treatment reduce the size of the longest neurite by 25% ($n = 3210$ for control, $n = 2619$ for nocodazole treated) but not on axons of polarized cells ($n = 297$ for control and $n = 175$ for treated). (B) Nocodazole treatment reduces the number of primary neurites of polarized (3.70 ± 0.14 vs 2.72 ± 0.12 for treated) or unpolarized (4.43 ± 0.14 vs 3.51 ± 0.13 for treated) neurons. p values were obtained from Mann-Whitney tests.

<https://doi.org/10.1371/journal.pone.0234529.g004>

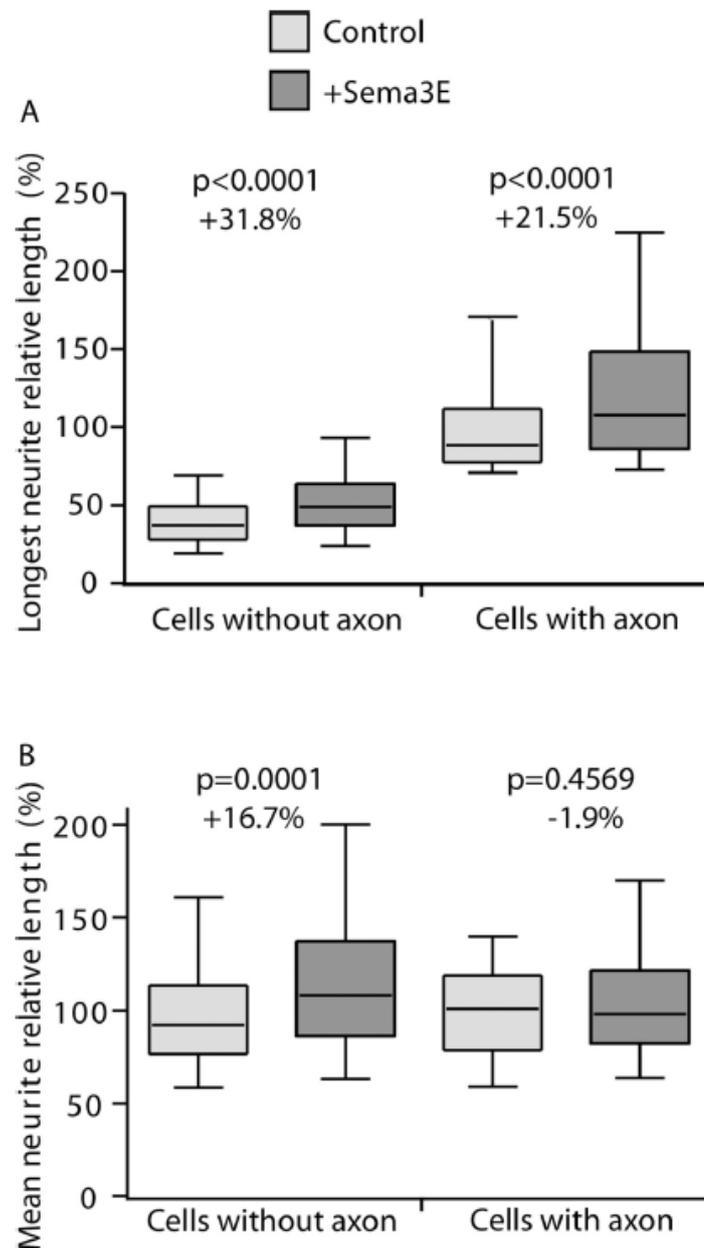


Fig 5. Effect of Sema3E treatment on the length of major neurites. Three independent mouse neuronal cultures were treated with Sema3E. At 2DIV, neurons were processed for quantification. (A) Length of the longest neurites for polarized and unpolarized cells treated or not with Sema3E. (Cells without axon: $n = 2211$ for control and $n = 1512$ for Sema3E treated condition; Cells with axon: $n = 126$ in control and $n = 426$ in Sema3E treated). (B) Mean length of primary neurites of polarized and unpolarized cells (Cells without axon: $n = 2073$ for control, $n = 1473$ for Sema3E treated condition; Cells with axon: $n = 102$ for control and $n = 384$ Sema3E treated). p values were obtained from Mann-Whitney tests.

<https://doi.org/10.1371/journal.pone.0234529.g005>

Thus, we tested if the mean length of dendrites of polarized cells and the mean length of primary neurites without the longest neurite in unpolarized cells were also sensitive to Sema3E treatment (Fig 5B). As AutoNeuriteJ classify the order of neurites we collected the length of dendrites from polarized neurons (Fig 1). The length of the dendrites of polarized cells is not affected by the Sema3E treatment (Fig 5B). On the contrary, the mean length of primary neurites of unpolarized neurons excluding the longest is increased by 16.7% after Sema3E treatment (Fig 5B). We conclude that Sema3E affects all primary neurites outgrowth during early neuron developmental stages 1 and 2. During subicular neuron polarization, Sema3E induces axonal outgrowth stimulation with no effect on dendrites revealing a cell growth oriented toward the axon. The global neuritic outgrowth observed with Sema3E at early stages could be a shared property for the third class of semaphorins as neuritic outgrowth effects were also reported for Sema3A and 3C [17–19]. Nevertheless, these observations were based on global neuritic length assessments but no direct comparison between axonal versus dendritic effects of semaphorins had been reported until now.

Overall, these results showed that AutoNeuriteJ easily allows a direct comparison of several parameters of neuronal arborization at different developmental stages.

Morphological analysis of MAP6 knock-out neurons

In our lab, we produced a mouse MAP6 knockout. MAP6 encodes for a protein that stabilized microtubules and is present in their lumen [20]. The MAP6 KO mice present numerous behavioral defects that were alleviated by neuroleptic treatment. Therefore they are a model of psychiatric disorders such as schizophrenia or depression [21, 22]. These mice also present brain anatomy perturbations where white matter tracts are altered as in fornix, corpus callosum or pyramidal tracts [2, 23]. The analysis of neurons in culture from these mice have shown that they present a defect in the Sema3E response and perturbation of the actin filament organization in dendritic spines [2, 24]. No detailed morphometric analysis of these neurons has been done yet. Taking advantages of automatic quantification, we cultivated hippocampal neurons from MAP6 KO or WT mouse littermates. The coverslips were recovered after 48h in culture, stained with antibody against tubulin and neuronal morphology analyzed with AutoNeuriteJ (Fig 6). The polarization index was increased in MAP6 KO neuron cultures (from 9.2% for WT neurons to 16.1% for MAP KO). Moreover, we were able to detect that MAP6 KO neurons produced longer axons than the controls by 23.5% (Fig 6A). Furthermore, thanks to the ability of AutoNeuriteJ to identify axonal primary and secondary branches we performed a measurement of the total axonal tree (axon plus its branches) in both genotypes. We found an increase of 20.2% of the size of MAP6 KO axonal tree as compared to WT neurons (Fig 6B). AutoNeuriteJ also allows determining the mean internode distance (axonal tree divided by the number of branches) which was also found increased by 19.7% in MAP6 KO neurons as compared to WT (Fig 6C). Thus MAP6 KO neurons increase all their axonal branches to the same extend after specification of the axon resulting in an increased internodes length. Overall, MAP6 KO experiments show the capacity of AutoNeuriteJ to detect variations of both classical and more subtle morphological features of neurons in culture.

Discussion

We developed a new ImageJ macro able to measure neuron morphology in several neuronal culture conditions. Existing plugins provide only global measurement of neuronal growth, while AutoNeuriteJ allows for quantification of individual neurons. AutoNeuriteJ can also give

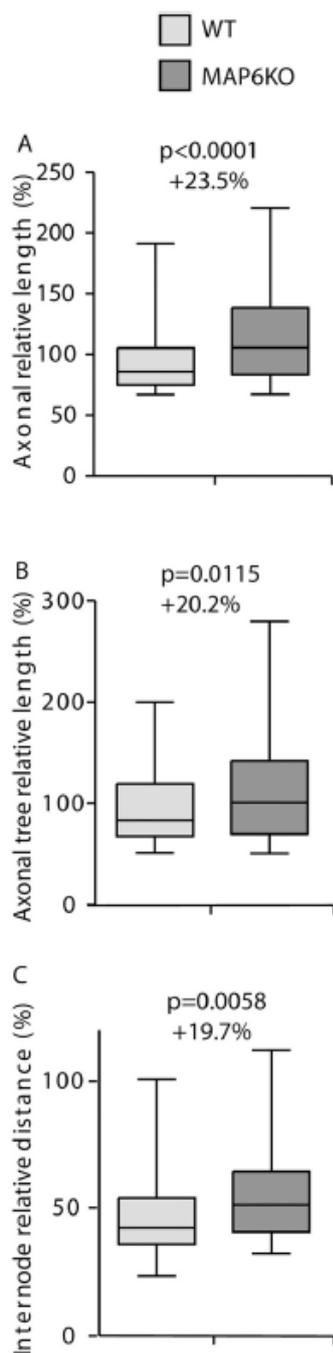


Fig 6. MAP6 deletion enhances axonal growth. Neurons from control and MAP6 KO mice from three independent experiments were processed for quantification. (A) Axon length for WT and MAP6 KO mice (n = 120 for WT, n = 207 for MAP6 KO). (B) Axonal tree length of polarized neurons (n = 120 for WT, n = 207 for MAP6 KO). (C) Internode distance of polarized neurons (n = 54 for WT, n = 117 for MAP6 KO). p values were obtained from Mann-Whitney tests.

<https://doi.org/10.1371/journal.pone.0234529.g006>

a global analysis of the culture by building a stack of the segmented neurons with specific colors for the neurites order, overlaid on the original image.

The macro produces a neuron-centric analysis with the classification of neurite. This provides the possibility to analyze crucial steps during neuronal differentiation and maturation. The classification of neurites gives the percentage of polarization of the culture, an essential marker of neuronal differentiation. It also allows the distinction of the effect of a molecule on different types of neurites as demonstrated in this study with the differential effect of nocodazole on axons and dendrites. To our knowledge, without AutoNeuriteJ, this was only achievable by manual tracing.

We performed Sema3E experiment as a validation test of AutoNeuriteJ. We observed, as expected, an increased length of the major neurites in polarized and unpolarized neurons. In polarized neuron, we found that the dendrites do not respond anymore to Sema3E treatment. Interestingly CRMP2, a downstream effectors of semaphorins, is enriched in axons whereas it is uniformly expressed in all neurites in unpolarized neurons [25]. We can thus speculate that the relocalization of CRMPs toward axons could limit the dendritic response to Sema3E stimulation after axonal specification.

AutoNeuriteJ also detects various morphologic differences between WT and genetically modified neurons allowing proposing mechanistic scenarios. The experiments on MAP6 KO neurons show that, consistent with its role of stabilization of microtubule, the absence of MAP6 increases the dynamics of microtubule and allows a faster growth of the axon and of the axonal tree. These results strengthen the previously described role of MAP6 in axonal development [26].

In conclusion, AutoNeuriteJ is an accessible tool that facilitates the classification and measurement of neurites. Hopefully it will make easier, for other investigators, the morphometric analysis of neurons during early differentiation.

Material & methods

Hippocampal and subicular neuron cultures

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 of Research.

Brains from embryos (E17.5) were dissected and hippocampus or subiculum were removed. Selected parts were dissociated and plated onto polylysine/laminin-coated as previously described [2]. The axonal growth of subicular neurons were stimulated by addition of control AP or Sema3E-AP (6.3nM) in supernatant 2h after cells plating [2]. After 2DIV, cultured cells were fixed and immunostained. Hippocampal neurons were treated by addition of 50nM nocodazole in the medium. After 2DIV, cultured cells were fixed and immunostained.

Immunostaining

Cells were fixed at 37°C in 4% paraformaldehyde, 4% sucrose in phosphate buffered saline (PBS) and permeabilized using 0.1% Triton X-100 in PBS 1min. Cells were then incubated with α 3A1 mouse primary antibody produced in the laboratory (1:10,000) for 1h at room temperature. Cells were washed thrice in PBS 0.1 tween and incubated with cyanine-3 conjugated secondary antibody (1:1000) for 1h at room temperature. After three final washes, nuclei were stained using Hoechst 33258 (1 μ g/ml) in the mounting media (Dako).

Image acquisition

For manual neuron morphometry, images of each neuron were acquired using 20 X N.A 0.5 objective on an Axioskop 50 microscope (Zeiss). All images were combined in a single file for an easier manipulation. Measure of axonal length was performed using NeuronJ [5].

For automated neuron morphometry, mosaic images of 2 or more ROI per condition were acquired using a 20x N.A 0.8 objective on an Axioscan Z1 (ZEISS) microscope. Mosaic images were then processed with AutoNeuriteJ.

Statistical analysis

Statistical analyses were performed using Prism 5 (GraphPad). For the Sema3E and MAP6 KO experiments, values were normalized for each independent experiment to the value of the mean axonal length in the corresponding control condition. Weighting of independent experiments was obtained by random draw of equal number of neurons in each experiment before pooling values for statistical analysis. In box and whiskers figures the whiskers represent 5 to 95% of the values. Percentage of variation indicated in Figs 5 and 6 are calculated from the median values. For all figures the statistical tests used are indicated in the figure legends.

User recommendations and drawbacks

Culture density and immunofluorescence. Several antibodies can be used for AutoNeuriteJ analysis. Our general recommendation here would be to use markers widespread in all neurons with a strong signal in order to accurately detect smaller neurite structures by setting low detection thresholds. As tubulin is the major protein of neurons, several anti-tubulin antibodies are useful. In the present study, we used a homemade anti-alpha tubulin antibody (α 3A1) but other anti tubulin can be used as a classical anti- β III tubulin specific for neuronal cells or anti-acetylated tubulin antibody that detects only stable microtubules, present in the shafts of neuritic extensions.

AutoNeuriteJ was developed to analyze the first steps of neuron differentiation. It does not consider neurons with overlapping neurites, thus creating a bias in the population considered. This problem also occurs when the measures are done by hand, it is generally circumvented in the field by using low density culture of neurons. To this end it is very important for users to verify a low neuronal density before performing immunostaining.

Image resolution. As AutoNeuriteJ is dedicated to neurite measurement, it does not need high resolution images to properly operate (1 μ m pixel size images are recommended). High resolution images will increase the duration of image processing as neurite measurement is based on pixel erosion. To circumvent this issue, AutoNeuriteJ part I performs scaling of images.

Quantification speed and computer requirements. Time for completion of this macro depends mostly on the number of counted neurons and neurites. From our experience we recommend to analyze images with no more than 500 neurons. This number is sufficient for comparing several groups of treatment or genotypes. If more neurons are needed, it is possible to run several occurrences of Fiji in parallel. As an example, we used eight occurrences of Fiji running at the same time on the same computer to measure 30,000 neurons in less than 12h.

Availability

AutoNeuriteJ and a user guide are available at GitHub (<https://github.com/Grenoble-Institute-Neurosciences/AutoNeuriteJ>). First and last authors may also be contacted for details or future collaborations.

Supporting information

S1 Data.

(ZIP)

S2 Data.

(ZIP)

Acknowledgments

The authors want to thank Thomas Brown for his comments and manuscript corrections. We also thank S. Andrieu, M. Lapierre, L. Romian, F. Mehr, and F. Rimet for animal care and F. Vossier and L. De Macedo for mouse genotyping. The Photonic Imaging Center of Grenoble Institute Neuroscience (Univ Grenoble Alpes–Inserm U1216) is part of the ISdV core facility and certified by the IBI SA label.

Author Contributions

Conceptualization: Benoit Boulan, Anne Beghin, Eric Denarier.

Formal analysis: Jacques Brocard.

Funding acquisition: Annie Andrieux.

Investigation: Charlotte Ravanello, Jean-Christophe Deloulme, Sylvie Gory-Fauré.

Methodology: Jacques Brocard.

Resources: Sylvie Gory-Fauré.

Software: Benoit Boulan, Anne Beghin, Eric Denarier.

Writing – original draft: Benoit Boulan, Eric Denarier.

Writing – review & editing: Benoit Boulan, Annie Andrieux, Eric Denarier.

References

1. Dawson HN, Ferreira A, Eyster MV, Ghoshal N, Binder LI, Vitek MP. Inhibition of neuronal maturation in primary hippocampal neurons from τ deficient mice. *J Cell Sci*. 2001; 114: 1179–1187. PMID: [11228161](https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/11228161/)
2. Deloulme J-C, Gory-Fauré S, Mauconduit F, Chauvet S, Jonckheere J, Boulan B, et al. Microtubule-associated protein 6 mediates neuronal connectivity through Semaphorin 3E-dependent signalling for axonal growth. *Nat Commun*. 2015; 6: 7246. <https://doi.org/10.1038/ncomms8246> PMID: [26037503](https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/26037503/)
3. Kikuchi K, Shiota J, Yamada T, Ishikawa M, Ihara D, Fukuchi M, et al. Rho signaling inhibitor, CCG-1423, inhibits axonal elongation and dendritic complexity of rat cortical neurons. *Biochem Biophys Res Commun*. 2017; 492: 474–479. <https://doi.org/10.1016/j.bbrc.2017.08.071> PMID: [28830810](https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/28830810/)
4. Banker G. The Development of Neuronal Polarity: A Retrospective View. *J Neurosci Off J Soc Neurosci*. 2018; 38: 1867–1873. <https://doi.org/10.1523/JNEUROSCI.1372-16.2018> PMID: [29467146](https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/29467146/)
5. Meijering E, Jacob M, Sarria J-C, Steiner P, Hirling H, Unser M. Design and validation of a tool for neurite tracing and analysis in fluorescence microscopy images. *Cytometry A*. 2004; 58: 167–176. <https://doi.org/10.1002/cyto.a.20022> PMID: [15057970](https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/15057970/)
6. Popko J, Fernandes A, Brites D, Lanier LM. Automated analysis of NeuronJ tracing data. *Cytometry A*. 2009; 75: 371–376. <https://doi.org/10.1002/cyto.a.20660> PMID: [18937344](https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/18937344/)
7. Haas AJ, Prigent S, Dutertre S, Le Dréan Y, Le Page Y. Neurite analyzer: An original Fiji plugin for quantification of neuritogenesis in two-dimensional images. *J Neurosci Methods*. 2016; 271: 86–91. <https://doi.org/10.1016/j.jneumeth.2016.07.011> PMID: [27450924](https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/27450924/)
8. Meijering E. Neuron tracing in perspective. *Cytometry A*. 2010; 77: 693–704. <https://doi.org/10.1002/cyto.a.20895> PMID: [20583273](https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/20583273/)

9. Pool M, Thiemann J, Bar-Or A, Fournier AE. NeuriteTracer: a novel ImageJ plugin for automated quantification of neurite outgrowth. *J Neurosci Methods*. 2008; 168: 134–139. <https://doi.org/10.1016/j.jneumeth.2007.08.029> PMID: 17936365
10. Arganda-Carreras I, Fernández-González R, Muñoz-Barrutia A, Ortiz-De-Solorzano C. 3D reconstruction of histological sections: Application to mammary gland tissue. *Microsc Res Tech*. 2010; 73: 1019–1029. <https://doi.org/10.1002/jemt.20829> PMID: 20232465
11. Shi S-H, Jan LY, Jan Y-N. Hippocampal neuronal polarity specified by spatially localized mPar3/mPar6 and PI 3-kinase activity. *Cell*. 2003; 112: 63–75. [https://doi.org/10.1016/s0092-8674\(02\)01249-7](https://doi.org/10.1016/s0092-8674(02)01249-7) PMID: 12526794
12. Ferreira TA, Blackman AV, Oyrer J, Jayabal S, Chung AJ, Watt AJ, et al. Neuronal morphometry directly from bitmap images. *Nat Methods*. 2014; 11: 982–984. <https://doi.org/10.1038/nmeth.3125> PMID: 25264773
13. Baudoin J-P, Alvarez C, Gaspar P, Métin C. Nocodazole-induced changes in microtubule dynamics impair the morphology and directionality of migrating medial ganglionic eminence cells. *Dev Neurosci*. 2008; 30: 132–143. <https://doi.org/10.1159/000109858> PMID: 18075261
14. Zhang S-X, Duan L-H, Qian H, Yu X. Actin Aggregations Mark the Sites of Neurite Initiation. *Neurosci Bull*. 2016; 32: 1–15. <https://doi.org/10.1007/s12264-016-0012-2> PMID: 26779918
15. Witte H, Neukirchen D, Bradke F. Microtubule stabilization specifies initial neuronal polarization. *J Cell Biol*. 2008; 180: 619–632. <https://doi.org/10.1083/jcb.200707042> PMID: 18268107
16. Chauvet S, Cohen S, Yoshida Y, Fekrane L, Livet J, Gayet O, et al. Gating of Semaphorin3E/PlexinD1 signaling by neuropilin-1 switches axonal repulsion to attraction during brain development. *Neuron*. 2007; 56: 807–822. <https://doi.org/10.1016/j.neuron.2007.10.019> PMID: 18054858
17. Ben-Zvi A, Ben-Gigi L, Yagil Z, Lerman O, Behar O. Semaphorin3A regulates axon growth independently of growth cone repulsion via modulation of TrkA signaling. *Cell Signal*. 2008; 20: 467–479. <https://doi.org/10.1016/j.cellsig.2007.10.023> PMID: 18096366
18. Moreno-Flores MT, Martín-Aparicio E, Martín-Bermejo MJ, Agudo M, McMahon S, Avila J, et al. Semaphorin 3C preserves survival and induces neuritogenesis of cerebellar granule neurons in culture. *J Neurochem*. 2003; 87: 879–890. <https://doi.org/10.1046/j.1471-4159.2003.02051.x> PMID: 14622119
19. Niclou SP, Franssen EHP, Ehlert EME, Taniguchi M, Verhaagen J. Meningeal cell-derived semaphorin 3A inhibits neurite outgrowth. *Mol Cell Neurosci*. 2003; 24: 902–912. [https://doi.org/10.1016/s1044-7431\(03\)00243-4](https://doi.org/10.1016/s1044-7431(03)00243-4) PMID: 14697657
20. Cuveillier C, Delaroché J, Seggio M, Gory-Fauré S, Bosc C, Denarier E, et al. MAP6 is an intraluminal protein that induces neuronal microtubules to coil. *Sci Adv*. 2020; 6: eaaz4344. <https://doi.org/10.1126/sciadv.aaz4344> PMID: 32270043
21. Andrieux A, Salin PA, Vernet M, Kujala P, Baratier J, Gory-Fauré S, et al. The suppression of brain cold-stable microtubules in mice induces synaptic defects associated with neuroleptic-sensitive behavioral disorders. *Genes Dev*. 2002; 16: 2350–2364. <https://doi.org/10.1101/gad.223302> PMID: 12231625
22. Jonckheere J, Deloulme J-C, Dall'igna G, Chauliac N, Pelluet A, Nguon A-S, et al. Short- and long-term efficacy of electroconvulsive stimulation in animal models of depression: The essential role of neuronal survival. *Brain Stimulat*. 2018 [cited 18 Sep 2018]. <https://doi.org/10.1016/j.brs.2018.08.001> PMID: 30146428
23. Gimenez U, Boulan B, Mauconduit F, Taurel F, Ledercq M, Denarier E, et al. 3D imaging of the brain morphology and connectivity defects in a model of psychiatric disorders: MAP6-KO mice. *Sci Rep*. 2017; 7: 10308. <https://doi.org/10.1038/s41598-017-10544-2> PMID: 28871106
24. Peris L, Bisbal M, Martínez-Hernández J, Saoudi Y, Jonckheere J, Rolland M, et al. A key function for microtubule-associated-protein 6 in activity-dependent stabilisation of actin filaments in dendritic spines. *Nat Commun*. 2018; 9: 3775. <https://doi.org/10.1038/s41467-018-05869-z> PMID: 30224655
25. Fukata Y, Kimura T, Kaibuchi K. Axon specification in hippocampal neurons. *Neurosci Res*. 2002; 43: 305–315. [https://doi.org/10.1016/s0168-0102\(02\)00062-7](https://doi.org/10.1016/s0168-0102(02)00062-7) PMID: 12135774
26. Tortosa E, Adolfs Y, Fukata M, Pasterkamp RJ, Kapitein LC, Hoogenraad CC. Dynamic Palmitoylation Targets MAP6 to the Axon to Promote Microtubule Stabilization during Neuronal Polarization. *Neuron*. 2017; 94: 809–825.e7. <https://doi.org/10.1016/j.neuron.2017.04.042> PMID: 28521134

Discussion et perspectives

Au cours de ma thèse j'ai participé à la caractérisation du rôle de CRMP4 dans la signalisation Sema3E, indispensable au développement du post-commissure. Parmi les différents candidats CRMP potentiels pouvant jouer un rôle dans cette cascade de signalisation, seule l'absence de CRMP4 impacte la croissance axonale induite par la Sema3E dans des cultures de neurones du subiculum. J'ai pu compléter l'étude neuroanatomique réalisée sur des cerveaux de souris CRMP4 KO et Sema3E^{+/-}CRMP4^{+/-}, mettant en évidence une altération du développement de la post-commissure chez ces animaux et confirmant *in vivo* l'implication de CRMP4 dans la signalisation Sema3E. J'ai ensuite montré que CRMP4 interagit avec le complexe tripartite de récepteurs à cette molécule de guidage, la Nrp1, la PlxD1 et le VEGFR2 à l'intérieur de micro-domaines spécifiques de la membrane, les DRM. J'ai également pu mettre en évidence que la signalisation Sema3E, via vraisemblablement le recrutement de la voie PI3K/Akt/GSK3 β , induit la phosphorylation de CRMP4 et que ce mécanisme est dépendant de l'intégrité des DRM. Enfin j'ai pu caractériser l'importance du domaine de liaison au cytosquelette de CRMP4 dans la capacité des neurones à voir leur élongation axonale stimulée par la Sema3E.

En parallèle j'ai pu participer au développement d'une macro ImageJ permettant l'analyse de la morphologie d'un grand nombre de neurones, un paramètre essentiel à l'étude des mécanismes de croissance axonale

J'ai également contribué à la rédaction d'une revue sur MAP6 et les CRMP, synthétisant leur rôle non seulement de régulateur du cytosquelette via leur fonction de MAP mais mettant également en valeur leur implication dans diverses cascades de signalisation à travers leurs interactions avec différents partenaires protéiques.

Le développement qui va suivre sera consacré à discuter des résultats expérimentaux présentés dans l'article *CRMP4 mediates fornix development through semaphorin-3E signaling pathway* qui constituent la grande majorité de mes travaux de thèse.

Les CRMP, fonctions partagées et rôles propres à une isoforme

L'inhibition de l'expression de CRMP1, CRMP2 et CRMP4 dans des cultures de neurones de subiculum conduit à une stimulation de la croissance des axones (bien que l'effet ne soit pas significatif pour CRMP1). Ces résultats suggèrent qu'il existerait des rôles communs aux différentes isoformes de CRMP, pouvant être expliqués par le fort pourcentage d'homologie de séquence que partagent ces protéines. En revanche, seule l'absence de CRMP4 conduit au blocage de l'effet stimulateur de la croissance axonale induit par la Sema3E. L'équipe de Goshima s'est attachée ces dernières années à caractériser les phénomènes de redondance et de compensation entre CRMP ainsi que les rôles propres à chaque isoforme dans différents mécanismes neurodéveloppementaux. CRMP1, CRMP2 et CRMP4 ont été toutes les trois impliquées dans le développement dendritique. L'absence de CRMP1 ou de CRMP4 conduit à une perturbation de la ramification des dendrites au niveau de l'hippocampe (Niisato et al., 2012; Takaya et al., 2017). De plus, les souris exprimant un mutant de CRMP2 mimant une phosphorylation constitutive (CRMP2 KI) et les souris CRMP1 KO présentent des défauts de morphologie des dendrites corticales (Yamashita et al., 2012). Cependant, bien que ces protéines aient également été toutes les trois retrouvées dans des mécanismes en lien avec la Sema3A, leurs fonctions dans la signalisation induite par cette molécule de guidage diffèrent. En effet Makihara et al. ont montré qu'il existait une interaction génétique entre la Sema3A et CRMP1 ainsi qu'entre la Sema3A et CRMP2 dans la maturation des épines dendritiques corticales, mais pas entre CRMP1 et CRMP2 (Makihara et al., 2016). De plus CRMP4 est impliquée dans la mise en place des dendrites au niveau de l'hippocampe comme un effecteur de la signalisation Sema3A alors que dans le cortex, son rôle dans le développement dendritique est indépendant de l'action de cette molécule de guidage. Il existe donc des rôles partagés par plusieurs CRMP et à l'inverse, d'autres fonctions sont attribuables à une CRMP en particulier plutôt qu'à une autre, notamment dans la médiation de signaux induits par des sémaphorines. Nos résultats s'inscrivent dans le prolongement des publications qui viennent d'être citées en montrant qu'au niveau des neurones du subiculum les CRMP 1, 2 et 4 régulent toutes les trois la croissance basale des axones mais que seule CRMP4 est responsable de la croissance dépendante de la Sema3E de ces axones.

CRMP4, une protéine impliquée dans des voies attractives mais qui pourrait aussi être un acteur de signalisations répulsives?

Dans un contexte de médiation de signaux de guidage, CRMP4 a été retrouvée, en dehors de la voie Sema3E, dans la stimulation de la croissance des dendrites en réponse à la Sema3A et également dans l'élongation axonale de certains neurones du système nerveux périphérique sous le contrôle de la Sema3D (Niisato et al., 2012; Tanaka et al., 2011). CRMP4 semblerait donc être impliquée essentiellement dans des voies attractives de signalisation des sémaphorines. A l'inverse CRMP2 a été beaucoup étudiée dans un contexte de collapse ou d'élagage des axones induit par des sémaphorines, sous-tendant qu'une isoforme en particulier pourrait médier les mécanismes d'attraction alors qu'une autre serait retrouvée dans la répulsion (Goshima et al., 1995; Ziak et al., 2020). Cependant, l'étude neuroanatomique du cerveau des souris CRMP4 suggère qu'hormis l'altération du développement du fornix post-commissural, un élargissement des projections striatonigrales pourrait également être observé (résultats préliminaires non montrés). Le développement de cette structure est dépendant de la signalisation répulsive de la Sema3E, impliquant le récepteur PlxD1 (Burk et al., 2017; Chauvet et al., 2007; Ehrman et al., 2013). Les souris invalidées pour le gène codant pour la PlxD1 présentent une décompaction des fibres qui constituent ce tract assurant la connexion entre le striatum et la substance noire (Burk et al., 2017). Le phénotype observé par Burk et al. est très similaire à celui de nos souris CRMP4 KO. Il serait intéressant de regarder dans un système proche de celui que nous avons utilisé, à savoir dans des cultures de neurones mais cette fois-ci de striatum ou de cortex, sur lesquels la Sema3E exerce aussi un effet répulsif, si CRMP4 est nécessaire à la médiation du signal induit par cette molécule de guidage. Si, comme cela a été cité plus haut, dans les signalisations dépendantes des sémaphorines, CRMP2 a été identifié comme médiant la répulsion, Yoshimura et al. ont montré que CRMP2 était impliqué dans l'élongation axonale induite par le BDNF et la neurotrophine. La Sema3A induit, via entre autres GSK3 β , la phosphorylation de CRMP2 bloquant ainsi son interaction avec les microtubules ce qui provoque l'effondrement du cône de croissance et la rétraction. A l'inverse le BDNF et la neurotrophine provoquent l'inhibition de GSK3 β par la signalisation PI3K/Akt, augmentant la proportion de CRMP2 non-phosphorylé et favorisant la croissance et le branchement de l'axone (Yoshimura et al., 2005). Ce dernier mécanisme est très similaire à celui que nous avons mis en évidence pour CRMP4 dans notre étude. De plus, si CRMP4 participe à la stimulation de l'élongation des axones dans la signalisation induite par la Sema3E, elle régule négativement cette élongation en condition basale dans des neurones de subiculum

en culture. Dans un mécanisme précis qu'est la croissance axonale des neurones du subiculum CRMP4 est donc capable, suivant la présence ou l'absence de la Sema3E, d'avoir des effets antagonistes. Ces éléments pourraient suggérer que plutôt que d'attribuer une fonction attractive à une CRMP et une fonction répulsive à une autre, une même CRMP pourrait avoir un rôle attractif ou répulsif, suivant le contexte moléculaire et l'état de phosphorylation/déphosphorylation dans lequel elle se trouve.

Les CRMP, une piste de recherche pour la compréhension de l'implication du fornix dans les maladies psychiatriques et neurodégénératives ?

L'étude neuroanatomique du cerveau des souris CRMP4 KO a mis en évidence un retard de développement du fornix post-commissural chez l'embryon et en post-natal, qui n'était pas totalement corrigé arrivé à l'âge adulte. Le fornix est une structure faisant partie du système limbique chargé de gérer différentes fonctions cognitives comme la mémoire et les émotions ainsi que la personnalité. Les CRMPs ont été impliquées dans plusieurs pathologies psychiatriques et neurodégénératives affectant le comportement et pour lesquelles une altération du fornix a été décrite (Clark et al., 2006; Hill et al., 2014; Martins-De-Souza et al., 2010; Pennington et al., 2008). Des changements dans leur expression respective ont été rapportés chez des patients atteints de schizophrénie. Des perturbations morphologiques dont une diminution du volume des fibres ont pu également être détectées par IRM mais sans qu'un lien soit fait entre ces deux éléments (Abdul-Rahman et al., 2011; Fitzsimmons et al., 2014; Koshiyama et al., 2020). Chez la souris, de récentes recherches ont suggéré que l'implication de CRMP2 et de CRMP4 dans les mécanismes induisant le développement de cette pathologie pourraient être en lien avec leur fonction cytosquelettique (Toyoshima et al., 2019; Yoshihara et al., 2021). Dans la maladie d'Alzheimer, différentes études ont mis en évidence une hyperphosphorylation de CRMP2 chez des patients ainsi que dans des modèles animaux de cette pathologie (Cole et al., 2007; Xing et al., 2016). Cette hyperphosphorylation, due à l'accumulation de peptide amyloïde β , bloque la capacité de CRMP2 à se lier aux microtubules, perturbe le transport axonal et favorise son interaction avec les récepteurs NMDA. Ces phénomènes conduisent à une modification de la morphologie neuritique, à des déficiences au niveau de la LTP ainsi qu'à une excitotoxicité accrue (Isono et al., 2013; Ji et al., 2019; Mokhtar et al., 2018). Il a été proposé que cette hyperphosphorylation de CRMP2 puisse être un marqueur propre à la maladie d'Alzheimer (Williamson et al., 2011). Le fornix de patients

atteints d'Alzheimer a été caractérisé comme étant atrophié par rapport à des sujets sains, cette atrophie pouvant être mise en corrélation avec une diminution des performances de mémorisation des sujets (Hattori et al., 2012; Ringman et al., 2007; Sánchez et al., 2020). La dégénérescence du fornix pourrait être un facteur de prédiction de l'apparition du déclin cognitif symptomatique de la maladie d'Alzheimer (Fletcher et al., 2013). Il existe donc un ensemble de données qui montrent en parallèle l'implication des CRMP et du fornix dans la pathogenèse de certaines maladies. Pour autant aucun lien direct n'avait encore été fait entre des perturbations de l'expression ou des fonctions des CRMP et des altérations du fornix. Nos résultats présentent une piste de recherche intéressante pour la compréhension du développement de certains troubles psychiatriques à travers une implication possible de CRMP4 dans les atteintes du fornix observées chez des patients. La réalisation de test de comportements sur les souris CRMP4 KO pourrait permettre de déterminer si les défauts observés au niveau de ce tract induisent des troubles du comportement comme une altération de la mémorisation, de l'anxiété ou des problèmes d'interaction sociales qui sont, entre autres, des caractéristiques de pathologies psychiatriques comme la schizophrénie (Joseph et al., 2015). A ce jour il n'existe que très peu d'informations sur le comportement de ces animaux hormis un article montrant que ces souris CRMP4 KO manifestent une perturbation de leur capacité à percevoir les odeurs qui a été mise en lien avec une hyperactivité de leur bulbe olfactif (Tsutiya et al., 2016).

DRM/radeaux lipidiques, une définition encore sujette à controverse du fait de la difficulté à visualiser ces structures in situ

Malgré le fait que CRMP4 et le complexe de récepteurs à la Sema3E soient présents dans différentes régions de la membrane plasmique, il est apparu que leur interaction avait lieu uniquement dans les DRM. De plus, l'intégrité de ces DRM est essentielle pour permettre la transduction du signal induit par la Sema3E et conduisant à la stimulation de l'élongation des axones. Ces résultats font écho à l'idée selon laquelle des domaines spécifiques de la membrane pourraient permettre le recrutement spatio-temporel d'acteurs d'une même signalisation même si ceux-ci peuvent s'avérer impliqués par ailleurs dans d'autres mécanismes. Cependant des difficultés persistent encore pour déterminer avec précision la nature exacte de ses domaines membranaires. En effet la définition de radeaux lipidiques couramment utilisée mais à laquelle nous avons préféré le terme, plus large, de DRM est toujours contestée à l'heure actuelle. Il

n'existe pas réellement de consensus sur les caractéristiques exactes de ces structures, la manière dont elles se forment et leur taille. A l'heure actuelle, l'étude des radeaux lipidiques en biologie passe majoritairement par l'utilisation de substances, comme la Méthyl- β -Cyclodextrine et de techniques de « clustering » qui altèrent la structure, modifient la dynamique de ces radeaux ou encore favorise le regroupement artificiel de lipides et de protéines, sans qu'il existe de moyen performant pour les visualiser *in situ*. De plus ces traitements perturbant l'organisation des radeaux lipidiques peuvent avoir un effet sur la membrane plasmique dans sa globalité car ce qui différencie les radeaux lipidiques du reste de la membrane réside plus dans la proportion des différents lipides et protéines qui les composent plutôt que sur la présence de constituants qui ne seraient pas retrouvés dans d'autres régions de la membrane. Nous n'avons, pour notre part, pas réussi à réaliser des expériences d'immunofluorescence convaincantes qui nous aurait permis de visualiser les DRM/ radeaux lipidiques et éventuellement la présence de nos protéines à l'intérieur. L'essor des techniques de microscopie à super-résolution permettra sans doute de faire évoluer de manière plus consensuelle la définition de ces radeaux lipidiques.

La phosphorylation de CRMP4, un moyen de réguler sa localisation?

La Sema3E induit, dans des cultures de neurones du subiculum, l'activation de la voie Akt/GSK3 β , conduit à l'augmentation de la proportion de CRMP4 non phosphorylée et à la croissance axonale. Dans la signalisation Sema3A, la phosphorylation de CRMP2 par GSK3 β entraîne le blocage de son interaction avec les microtubules et a un effet répulsif sur les neurones se traduisant par l'effondrement du cône de croissance. Il nous semblait judicieux de penser que dans la voie attractive Sema3E, la forme non-phosphorylée de CRMP4 se lierait aux microtubules, favorisant leur polymérisation ainsi que leur stabilisation, et stimulant l'élongation de l'axone. Cependant, les expériences de sauvetages réalisées dans des cultures de neurones du subiculum CRMP4 KO avec un mutant phosphomimétique de CRMP4 (CRMP4 4D) ont montré une restauration de l'effet de la Sema3E sur la croissance axonale, similaire à celui obtenu avec la forme sauvage de CRMP4 ou avec le mutant non phosphorylable (CRMP4 4A). La phosphorylation de CRMP4 ne semble donc pas avoir d'impact direct sur sa capacité à médier la réponse des neurones à la Sema3E. En revanche, son rôle dans cette signalisation passe bien par sa faculté à interagir avec le cytosquelette puisque l'utilisation de mutant délété des domaines de liaison à l'actine et aux microtubules ne restaure plus la croissance axonale. Une autre hypothèse peut être envisagée, selon laquelle la

phosphorylation de CRMP4 dans cette signalisation n'aurait pas la fonction de réguler sa capacité à interagir ou non avec le cytosquelette mais aurait pour but d'influencer sa localisation. Notre système de restauration de l'expression de CRMP4, grâce à l'utilisation de plasmides codants pour les constructions CRMP4 4A et CRMP4 4D, amène à une présence relativement ubiquitaire de nos protéines à l'intérieur du neurone, contournant ce problème de localisation. Cette théorie a été abordée pour une autre molécule de guidage, la sémaphorine 3D, pour laquelle CRMP4 participe également à la signalisation (Tanaka et al., 2011). Pour poursuivre cette étude et valider ou non cette hypothèse, il serait judicieux de regarder, au moyen de gradients réalisés à partir de cellules HEK transfectées avec les mutants CRMP4 4A et CRMP4 4D, si par exemple la forme phosphorylée n'était pas retrouvée préférentiellement localisée dans les fractions DRM. Il serait également intéressant de comprendre si la phosphorylation de CRMP4 influence sa capacité à interagir avec le complexe de récepteurs Sema3E. Outre la phosphorylation, qui permettrait donc potentiellement d'expliquer la localisation de CRMP4 à l'intérieur des DRM, une autre modification post-traductionnelle, la palmitoylation pourrait être une piste intéressante. En effet, de nombreuses études ont montré l'adressage de protéines palmitoylées dans les DRM/Radeaux lipidiques et un site de palmitoylation de CRMP2, conservé chez CRMP4 a été identifié (Cortada et al., 2021; Kwiatkowska et al., 2020; Yang et al., 2010).

MAP6 dans la signalisation Sema3E, une interaction fonctionnelle avec CRMP4?

Dans cette étude nous en sommes venus à nous intéresser aux rôles potentiels des CRMP dans la signalisation Sema3E par, entre autres, l'intermédiaire de la protéine MAP6. En effet, le laboratoire de Didier Job qui travaillait sur la physiopathologie du cytosquelette a découvert MAP6 et depuis de nombreux articles ont été publiés sur ce sujet, comme en témoigne la revue sortie en mai 2021 (Cuveillier et al., 2021). L'étude de la souris MAP6 KO, dont le développement du fornix post-commissural est quasi-inexistant, a permis de mettre en évidence le rôle crucial de cette protéine dans l'établissement de la connectivité neuronale (Deloulme et al., 2015; Gimenez et al., 2017). Deloulme et al. avaient montré que MAP6 régulait l'élongation des axones induite par la Sema3E via son domaine PRD (Prolin rich domain) situé dans la région N-terminale de cette protéine. En effet, des expériences de sauvetage réalisées, dans des cultures de neurones du subiculum MAP6 KO, avec un mutant MAP6 délété de cette région PRD était incapable de restaurer la stimulation de la croissance axonale générée par la Sema3E sur les neurones sauvages. En revanche et de manière surprenante, les domaines de MAP6 lui

permettant de lier et de stabiliser les microtubules n'étaient pas impliqués dans l'effet induit par cette molécule de guidage sur ces neurones. En effet, l'élongation axonale nécessitant comme cela a été décrit en introduction, un remodelage du cytosquelette et entre autres une favorisation de la polymérisation des microtubules, il était surprenant que le rôle de MAP6 dans la signalisation Sema3E ne passe pas par ce mécanisme. Des expériences d'immunoprécipitation ont finalement montré que MAP6 interagissait avec la PlxD1, la Nrp1 et le VEGFR2 et se localisait plutôt au niveau du complexe de récepteurs à la Sema3E qu'au niveau du cytosquelette. L'idée était ensuite de mieux comprendre le fonctionnement de cette cascade de signalisation induite par la Sema3E à travers la caractérisation des partenaires de MAP6 et l'identification, *in fine*, de potentiels régulateurs du cytosquelette. Les expériences de spectrométrie de masse ont permis de montrer que CRMP1, CRMP2 et CRMP4 s'associaient avec MAP6 et que CRMP4 jouait un rôle dans la signalisation Sema3E et le développement du fornix post-commissural. Ce rôle est dépendant de sa capacité à lier le cytosquelette. La caractérisation de ce nouvel acteur de cette cascade de signalisation soulève la question de la façon dont les fonctions de MAP6 et celles de CRMP4 s'articulent au sein de ce mécanisme. En effet CRMP4, aussi bien que MAP6 interagit avec le complexe de récepteurs à la Sema3E, et des expériences d'immunoprécipitation dont les résultats obtenus (non montrés) ont suggéré que la présence de l'une de ces protéines bloque la liaison de la deuxième aux récepteurs et inversement. MAP6 étant capable d'être palmitoylée, ce qui lui permet de se localiser au niveau de compartiments membranaires, elle pourrait elle aussi interagir avec ce complexe à l'intérieur de DRM (Gory-Fauré et al., 2014; Tortosa et al., 2017). Pour mieux caractériser l'organisation de la formation de ces complexes entre MAP6, CRMP4 et les récepteurs Sema3E, il faudrait dans un premier temps réaliser des gradients de sucrose ainsi que des immunoprécipitations pour déterminer si MAP6 est présente à l'intérieur de DRM, si son interaction avec les récepteurs dépend ou non de ces DRM et si sa présence modifie la répartition au sein des fractions du gradient de la PlxD1, de la Nrp1 et de CRMP4. De plus, des expériences de pulldown (résultats non montrés) ont permis d'identifier que la liaison entre CRMP4 et MAP6 a lieu via la région N-terminale de celle-ci. La suppression du domaine PRD contenue dans la partie N-terminale de MAP6 et essentiel à la signalisation Sema3E, semble renforcer l'interaction entre ces deux protéines. Ces résultats suggèrent que ce serait plutôt le blocage de l'interaction entre MAP6 et CRMP4 qui pourrait avoir un rôle fonctionnel dans la croissance des axones sous le contrôle de cette molécule de guidage. En effet, nous avons proposé l'idée que la phosphorylation/déphosphorylation de CRMP4 régulerait sa localisation, la forme phosphorylée étant potentiellement située plutôt avec le complexe de récepteurs au sein des

DRM alors que la forme déphosphorylée la placerait au niveau du cytosquelette. Il est possible d'imaginer que MAP6 et CRMP4 phosphorylée soit présentes et interagissent au niveau des DRM et que le domaine PRD de MAP6 puisse permettre le recrutement de protéines à SH2/SH3 comme PI3K dont la signalisation passant par Akt et GSK3 β conduit à la déphosphorylation de CRMP4 (Alabed et al., 2010; Deloulme et al., 2015). Cette forme déphosphorylée se désolidariserait des récepteurs et de MAP6 pour venir se lier au microtubules et/ou à l'actine et induire une élongation de l'axone. L'avancement de l'étude de la fonctionnalité de l'interaction entre MAP6 et CRMP4 dans la signalisation Sema3E est toutefois rendu compliqué car si la région de MAP6 se liant à CRMP4 a été identifiée il ne nous a pas été possible à l'inverse de caractériser le domaine de CRMP4 médiant son interaction avec MAP6. En effet, nous n'avons pas pu produire les billes de MAP6 purifiées nécessaires à la réalisation de pulldown. De plus, si CRMP4 et MAP6 sont impliquées toutes les deux dans la formation du fornix post-commissural, les phénotypes observés chez les souris CRMP4 KO et MAP6 KO au niveau de tract présentent des différences. En effet l'absence de CRMP4 induit un retard de développement du fornix post-commissural chez l'embryon et à PO, qui n'est pas totalement compensé chez l'adulte, assorti d'une défasciculation des fibres à son extrémité. Ce phénotype est très proche de celui observé chez les animaux Sema3E KO (Chauvet et al., 2007). En revanche chez les animaux MAP6 KO, une absence totale de progression des fibres de cette structure est notée au stade E18.5 et chez l'adulte seulement quelques-unes d'entre elles ont pu rejoindre les corps mamillaires (Deloulme et al., 2015; Gimenez et al., 2017). Il semblerait que le rôle de MAP6 dans l'établissement de la connectivité neuronale au niveau du fornix post-commissural passe non seulement par la médiation du signal induit par la Sema3E mais que MAP6 ait également une autre fonction dans l'établissement de ce tract, indépendant de l'effet de cette molécule de guidage. La caractérisation de l'implication d'une potentielle interaction fonctionnelle de CRMP4 et de MAP6 dans la signalisation Sema3E ne suffira pas à expliquer le rôle de MAP6 dans le développement du fornix post-commissural.

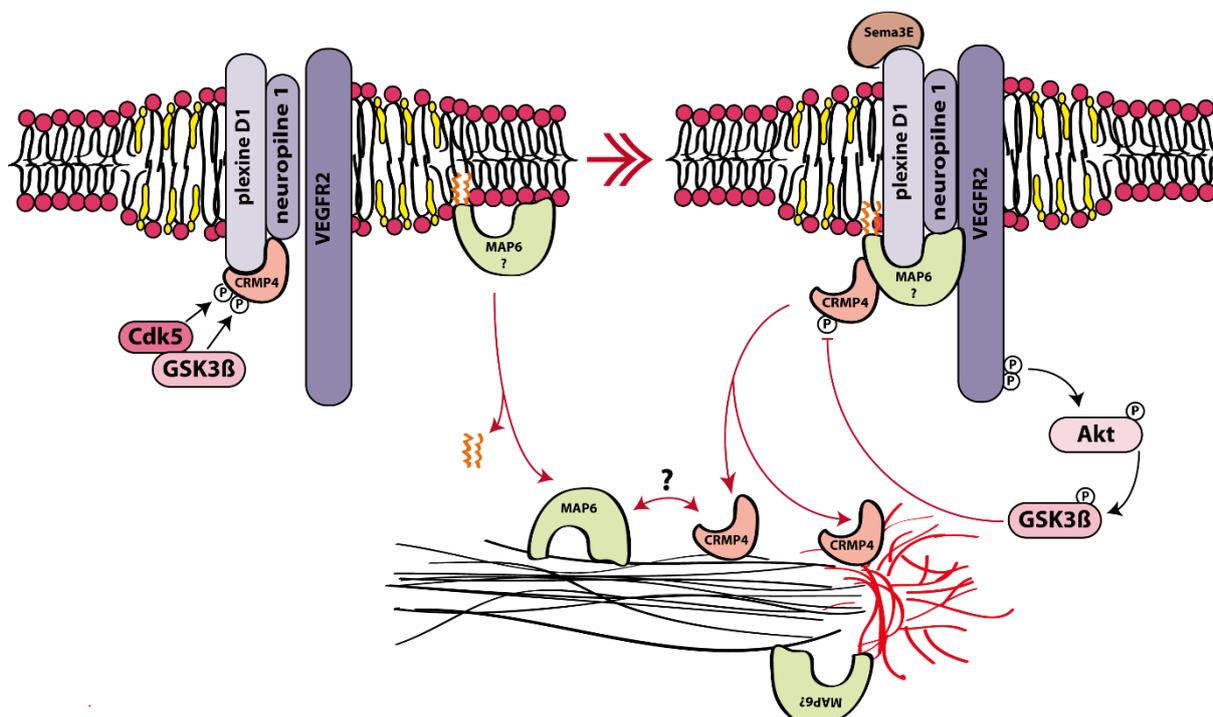


Figure 21 : Représentation schématique du fonctionnement potentiel de la signalisation attractive de la Sema3E dans les neurones du subiculum. En absence de Sema3E, CRMP4 phosphorylée interagit avec le complexe de récepteurs à l'intérieur des DRM. La liaison de la Sema3E à la PlxD, induit l'autophosphorylation de VEGFR2 et le recrutement de la voie Akt/GSK3β (facilité par MAP6 ?). Cette voie bloque la phosphorylation de CRMP4 qui peut alors interagir avec le cytosquelette et promouvoir l'élongation de l'axone.

La compréhension des processus régulant l'établissement de connexions spécifiques entre les neurones au cours de la mise en place du système nerveux est un domaine dans lequel il reste encore énormément à découvrir. Notre étude participe à une meilleure compréhension du fonctionnement d'une des nombreuses voies de signalisation qui existent, à travers l'analyse du rôle d'un nouvel acteur, CRMP4 impliqué dans le développement du fornix post-commissural sous le contrôle de la Sema3E. L'identification des effecteurs qui interviennent entre la liaison d'une molécule de guidage sur son récepteur et la régulation in fine du cytosquelette aboutissant à la croissance ou au contraire à la répulsion des axones demeure à ce jour difficile. A travers l'interprétation des différents résultats que nous avons obtenus, nous avons essayé de proposer un mécanisme pouvant faire le lien entre le complexe de récepteurs de la Sema3E et le cytosquelette, permettant une meilleure compréhension d'une voie de signalisation essentielle à l'établissement de la connectivité neuronale au cours du développement du cerveau.

Références

- Abdallah, B. M., Figeac, F., Larsen, K. H., Ditzel, N., Keshari, P., Isa, A., Jafari, A., Andersen, T. L., Delaisse, J. M., Goshima, Y., Ohshima, T., & Kassem, M. (2017). CRMP4 Inhibits Bone Formation by Negatively Regulating BMP and RhoA Signaling. *Journal of Bone and Mineral Research*, 32(5), 913–926. <https://doi.org/10.1002/jbmr.3069>
- Abdul-Rahman, M. F., Qiu, A., & Sim, K. (2011). Regionally specific white matter disruptions of fornix and cingulum in schizophrenia. *PLoS ONE*, 6(4), 1–11. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0018652>
- Aggleton, J. P., & Christiansen, K. (2015). The subiculum: The heart of the extended hippocampal system. In *Progress in Brain Research* (1st ed., Vol. 219). Elsevier B.V. <https://doi.org/10.1016/bs.pbr.2015.03.003>
- Aizawa, H., Wakatsuki, S., Ishii, A., Moriyama, K., Sasaki, Y., Ohashi, K., Sekine-Aizawa, Y., Sehara-Fujisawa, A., Mizuno, K., Goshima, Y., & Yahara, I. (2001). Phosphorylation of cofilin by LIM-kinase is necessary for semaphorin 3A-induced growth cone collapse. *Nature Neuroscience*, 4(4), 367–373. <https://doi.org/10.1038/86011>
- Alabed, Y. Z., Pool, M., Tone, S. O., & Fournier, A. E. (2007a). Identification of CRMP4 as a convergent regulator of axon outgrowth inhibition. *Journal of Neuroscience*, 27(7), 1702–1711. <https://doi.org/10.1523/JNEUROSCI.5055-06.2007>
- Alabed, Y. Z., Pool, M., Tone, S. O., & Fournier, A. E. (2007b). Identification of CRMP4 as a convergent regulator of axon outgrowth inhibition. *Journal of Neuroscience*, 27(7), 1702–1711. <https://doi.org/10.1523/JNEUROSCI.5055-06.2007>
- Alabed, Y. Z., Pool, M., Tone, S. O., Sutherland, C., & Fournier, A. E. (2010). GSK3 β regulates myelin-dependent axon outgrowth inhibition through CRMP4. *Journal of Neuroscience*, 30(16), 5635–5643. <https://doi.org/10.1523/JNEUROSCI.6154-09.2010>
- Allen, J. A., Halverson-Tamboli, R. A., & Rasenick, M. M. (2007). Lipid raft microdomains and neurotransmitter signalling. In *Nature Reviews Neuroscience* (Vol. 8, Issue 2, pp. 128–140). <https://doi.org/10.1038/nrn2059>

- Amano, M., Chihara, K., Nakamura, N., Fukata, Y., Yano, T., Shibata, M., Ikebe, M., & Kaibuchi, K. (1998). Myosin II activation promotes neurite retraction during the action of Rho and Rho-kinase. *Genes to Cells*, 3(3), 177–188. <https://doi.org/10.1046/j.1365-2443.1998.00181.x>
- Anderson, R. G. W. (1998). THE CAVEOLAE MEMBRANE SYSTEM. In *Annu. Rev. Biochem* (Vol. 67). www.annualreviews.org
- Anderson, R. G. W., & Jacobson, K. (2002). Cell biology: A role for lipid shells in targeting proteins to caveolae, rafts, and other lipid domains. In *Science* (Vol. 296, Issue 5574). <https://doi.org/10.1126/science.1068886>
- Andrieux, A., Salin, P. A., Vernet, M., Kujala, P., Baratier, J., Gory-Fauré, S., Bosc, C., Pointu, H., Proietto, D., Schweitzer, A., Denarier, E., Klumperman, J., & Job, D. (2002). The suppression of brain cold-stable microtubules in mice induces synaptic defects associated with neuroleptic-sensitive behavioral disorders. *Genes and Development*, 16(18), 2350–2364. <https://doi.org/10.1101/gad.223302>
- Arimura, N., Hattori, A., Kimura, T., Nakamuta, S., Funahashi, Y., Hirotsune, S., Furuta, K., Urano, T., Toyoshima, Y. Y., & Kaibuchi, K. (2009). CRMP-2 directly binds to cytoplasmic dynein and interferes with its activity. *Journal of Neurochemistry*, 111(2), 380–390. <https://doi.org/10.1111/j.1471-4159.2009.06317.x>
- Arimura, N., Inagaki, N., Chihara, K., Ménager, C., Nakamura, N., Amano, M., Iwamatsu, A., Goshima, Y., & Kaibuchi, K. (2000). Phosphorylation of collapsin response mediator protein-2 by Rho-kinase: Evidence for two separate signaling pathways for growth cone collapse. *Journal of Biological Chemistry*, 275(31), 23973–23980. <https://doi.org/10.1074/jbc.M001032200>
- Arimura, N., & Kaibuchi, K. (2007). Neuronal polarity: From extracellular signals to intracellular mechanisms. *Nature Reviews Neuroscience*, 8(3), 194–205. <https://doi.org/10.1038/nrn2056>
- Arimura, N., Ménager, C., Kawano, Y., Yoshimura, T., Kawabata, S., Hattori, A., Fukata, Y., Amano, M., Goshima, Y., Inagaki, M., Morone, N., Usukura, J., & Kaibuchi, K. (2005). Phosphorylation by Rho Kinase Regulates CRMP-2 Activity in Growth Cones. *Molecular and Cellular Biology*, 25(22), 9973–9984.

<https://doi.org/10.1128/mcb.25.22.9973-9984.2005>

Averaimo, S., Assali, A., Ros, O., Couvet, S., Zagar, Y., Genescu, I., Rebsam, A., & Nicol, X. (2016). A plasma membrane microdomain compartmentalizes ephrin-generated cAMP signals to prune developing retinal axon arbors. *Nature Communications*, 7.

<https://doi.org/10.1038/ncomms12896>

Baas, P. W., Deitch, J. S., Black, M. M., & Banker, G. A. (1988). Polarity orientation of microtubules in hippocampal neurons: Uniformity in the axon and nonuniformity in the dendrite. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 85(21), 8335–8339. <https://doi.org/10.1073/pnas.85.21.8335>

Balastik, M., Zhou, X. Z., Alberich-Jorda, M., Weissova, R., Žiak, J., Pazyra-Murphy, M. F., Cosker, K. E., Machonova, O., Kozmikova, I., Chen, C. H., Pastorino, L., Asara, J. M., Cole, A., Sutherland, C., Segal, R. A., & Lu, K. P. (2015). Prolyl Isomerase Pin1 Regulates Axon Guidance by Stabilizing CRMP2A Selectively in Distal Axons. *Cell Reports*, 13(4), 812–828. <https://doi.org/10.1016/j.celrep.2015.09.026>

Baumann, A., & Kursula, P. (2017). SUMO on CRMPs - wrestling for pain? In *Channels* (Vol. 11, Issue 4, pp. 265–267). Taylor and Francis Inc.

<https://doi.org/10.1080/19336950.2017.1311758>

Beasley, C. L., Pennington, K., Behan, A., Wait, R., Dunn, M. J., & Cotter, D. (2006). Proteomic analysis of the anterior cingulate cortex in the major psychiatric disorders: Evidence for disease-associated changes. *Proteomics*, 6(11), 3414–3425.

<https://doi.org/10.1002/pmic.200500069>

Bellon, A., Luchino, J., Haigh, K., Rougon, G., Haigh, J., Chauvet, S., & Mann, F. (2010). VEGFR2 (KDR/Flk1) signaling mediates axon growth in response to semaphorin 3E in the developing brain. *Neuron*, 66(2), 205–219.

<https://doi.org/10.1016/j.neuron.2010.04.006>

Belzung, C., & Lemoine, M. (2011). Criteria of validity for animal models of psychiatric disorders: focus on anxiety disorders and depression. *Biology of Mood & Anxiety Disorders*, 1(1), 9. <https://doi.org/10.1186/2045-5380-1-9>

Benear, S. L., Ngo, C. T., & Olson, I. R. (2020). Dissecting the Fornix in Basic Memory Processes and Neuropsychiatric Disease: A Review. *Brain Connectivity*, 10(7), 331–354.

<https://doi.org/10.1089/brain.2020.0749>

- Bienkowski, M. S., Bowman, I., Song, M. Y., Gou, L., Ard, T., Cotter, K., Zhu, M., Benavidez, N. L., Yamashita, S., Abu-Jaber, J., Azam, S., Lo, D., Foster, N. N., Hintiryan, H., & Dong, H. W. (2018). Integration of gene expression and brain-wide connectivity reveals the multiscale organization of mouse hippocampal networks. *Nature Neuroscience*, *21*(11), 1628–1643. <https://doi.org/10.1038/s41593-018-0241-y>
- Bienkowski, M. S., Sepehrband, F., Kurniawan, N. D., Stanis, J., Korobkova, L., Khanjani, N., Clark, K., Hintiryan, H., Miller, C. A., & Dong, H. W. (2021). Homologous laminar organization of the mouse and human subiculum. *Scientific Reports*, *11*(1), 1–14. <https://doi.org/10.1038/s41598-021-81362-w>
- Black, M. M., Slaughter, T., & Fischer, Itzhak. (1994). Microtubule-associated Protein 1 b (MAP1 b) Is Concentrated in the Distal Region of Growing Axons. In *The Journal of Neuroscience* (Vol. 14, Issue 2).
- Block, J., Breitsprecher, D., Kühn, S., Winterhoff, M., Kage, F., Geffers, R., Duwe, P., Rohn, J. L., Baum, B., Brakebusch, C., Geyer, M., Stradal, T. E. B., Faix, J., & Rottner, K. (2012). FMNL2 drives actin-based protrusion and migration downstream of Cdc42. *Current Biology*, *22*(11), 1005–1012. <https://doi.org/10.1016/j.cub.2012.03.064>
- Blockus, H., & Chédotal, A. (2016). Slit-robo signaling. *Development (Cambridge)*, *143*(17), 3037–3044. <https://doi.org/10.1242/dev.132829>
- Boulan, B., Beghin, A., Ravanello, C., Deloulme, J.-C., Gory-Fauré, S., Andrieux, A., Brocard, J., & Denarier, E. (2020). AutoNeuriteJ: An ImageJ plugin for measurement and classification of neuritic extensions. *PLoS ONE*, *15*(7 July). <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0234529>
- Boyer, N. P., & Gupton, S. L. (2018). Revisiting netrin-1: One who guides (Axons). *Frontiers in Cellular Neuroscience*, *12*(July), 1–18. <https://doi.org/10.3389/fncel.2018.00221>
- Bradke, F., & Dotti, C. C. (1999). The role of local actin instability in axon formation. *Science*, *283*(5409), 1931–1934. <https://doi.org/10.1126/science.283.5409.1931>
- Bretin, S., Rogemond, V., Marin, P., Maus, M., Torrens, Y., Honnorat, J., Glowinski, J., Prémont, J., & Gauchy, C. (2006). Calpain product of WT-CRMP2 reduces the amount

- of surface NR2B NMDA receptor subunit. *Journal of Neurochemistry*, 98(4), 1252–1265. <https://doi.org/10.1111/j.1471-4159.2006.03969.x>
- Brisch, R., Bernstein, H.-G., Stauch, R., Dobrowolny, H., Krell, D., Truebner, K., Meyer-Lotz, G., Biela, H., Steiner, J., Kropf, S., Gos, T., Danos, P., & Bogerts, B. (2008). The volumes of the fornix in schizophrenia and affective disorders: A post-mortem study. *Psychiatry Research: Neuroimaging*, 164, 265–273. <https://doi.org/10.1016/j.psychres.2007.12.007>
- Brittain, J. M., Chen, L., Wilson, S. M., Brustovetsky, T., Gao, X., Ashpole, N. M., Molosh, A. I., You, H., Hudmon, A., Shekhar, A., White, F. A., Zamponi, G. W., Brustovetsky, N., Chen, J., & Khanna, R. (2011). Neuroprotection against traumatic brain injury by a peptide derived from the collapsin response mediator protein 2 (CRMP2). *Journal of Biological Chemistry*, 286(43), 37778–37792. <https://doi.org/10.1074/jbc.M111.255455>
- Brittain, J. M., Piekarczyk, A. D., Wang, Y., Kondo, T., Cummins, T. R., & Khanna, R. (2009). An atypical role for collapsin response mediator protein 2 (CRMP-2) in neurotransmitter release via interaction with presynaptic voltage-gated calcium channels. *Journal of Biological Chemistry*, 284(45), 31375–31390. <https://doi.org/10.1074/jbc.M109.009951>
- Brittain, J. M., Wang, Y., Eruvwetere, O., & Khanna, R. (2012). Cdk5-mediated phosphorylation of CRMP-2 enhances its interaction with CaV2.2. *FEBS Letters*, 586(21), 3813–3818. <https://doi.org/10.1016/j.febslet.2012.09.022>
- Brot, S., Rogemond, V., Perrot, V., Chounlamountri, N., Auger, C., Honnorat, J., & Moradi-Améli, M. (2010). CRMP5 interacts with tubulin to inhibit neurite outgrowth, thereby modulating the function of CRMP2. *Journal of Neuroscience*, 30(32), 10639–10654. <https://doi.org/10.1523/JNEUROSCI.0059-10.2010>
- Brown, D. A., & London, E. (2000). Structure and function of sphingolipid- and cholesterol-rich membrane rafts. *Journal of Biological Chemistry*, 275(23), 17221–17224. <https://doi.org/10.1074/jbc.R000005200>
- Brown, D. A., & Rose, J. K. (1992). Sorting of GPI-Anchored Proteins to Glycolipid-Enriched Membrane Subdomains during Transport to the Apical Cell Surface. In *Cell* (Vol. 66).
- Brown, M., Jacobs, T., Eickholt, B., Ferrari, G., Teo, M., Monfries, C., Qi, R. Z., Leung, T.,

- Lim, L., & Hall, C. (2004). α 2-chimaerin, cyclin-dependent kinase 5/p35, and its target collapsin response mediator protein-2 are essential components in semaphorin 3A-induced growth-cone collapse. *Journal of Neuroscience*, 24(41), 8994–9004.
<https://doi.org/10.1523/JNEUROSCI.3184-04.2004>
- Brückner, K., Labrador, J. P., Scheiffele, P., Herb, A., Seeburg, P. H., & Klein, R. (1999). EphrinB Ligands Recruit GRIP Family PDZ Adaptor Proteins into Raft Membrane Microdomains. *Neuron*, 22(3), 511–524. [https://doi.org/10.1016/S0896-6273\(00\)80706-0](https://doi.org/10.1016/S0896-6273(00)80706-0)
- Brustovetsky, T., Pellman, J. J., Yang, X. F., Khanna, R., & Brustovetsky, N. (2014). Collapsin response mediator protein 2 (CRMP2) interacts with N-methyl-D-aspartate (NMDA) receptor and Na⁺/Ca²⁺ exchanger and regulates their functional activity. *Journal of Biological Chemistry*, 289(11), 7470–7482.
<https://doi.org/10.1074/jbc.M113.518472>
- Bubb, E. J., Kinnavane, L., & Aggleton, J. P. (2017). Hippocampal–diencephalic–cingulate networks for memory and emotion: An anatomical guide. *Brain and Neuroscience Advances*, 1, 239821281772344. <https://doi.org/10.1177/2398212817723443>
- Buck, K. B., & Zheng, J. Q. (2002). Growth cone turning induced by direct local modification of microtubule dynamics. *Journal of Neuroscience*, 22(21), 9358–9367.
<https://doi.org/10.1523/jneurosci.22-21-09358.2002>
- Burnette, D. T., Schaefer, A. W., Ji, L., Danuser, G., & Forscher, P. (2007). Filopodial actin bundles are not necessary for microtubule advance into the peripheral domain of Aplysia neuronal growth cones. *Nature Cell Biology*, 9(12), 1360–1369.
<https://doi.org/10.1038/ncb1655>
- Bush, J. O., & Soriano, P. (2009). Ephrin-B1 regulates axon guidance by reverse signaling through a PDZ-dependent mechanism. *Genes and Development*, 23(13), 1586–1599.
<https://doi.org/10.1101/gad.1807209>
- Bussey, T. J., Duck, J., Muir, J. L., & Aggleton, J. P. (2000). Distinct patterns of behavioural impairments resulting from fornix transection or neurotoxic lesions of the perirhinal and postrhinal cortices in the rat. *Behavioural Brain Research*, 111(1–2), 187–202.
[https://doi.org/10.1016/S0166-4328\(00\)00155-8](https://doi.org/10.1016/S0166-4328(00)00155-8)

- Byk, T., Dobransky, T., Cifuentes-Diaz, C., & Sobel, A. (1996). Identification and Molecular Characterization of Uric-33-Like Phosphoprotein (Ulip), a Putative Mammalian Homolog of the Axonal Guidance-Associated uric-33 Gene Product. In *The Journal of Neuroscience* (Vol. 76, Issue 2).
- Cai, G., Wu, D., Wang, Z., Xu, Z., Wong, K. B., Ng, C. F., Chan, F. L., & Yu, S. (2017). Collapsin response mediator protein-1 (CRMP1) acts as an invasion and metastasis suppressor of prostate cancer via its suppression of epithelial-mesenchymal transition and remodeling of actin cytoskeleton organization. *Oncogene*, *36*(4), 546–558. <https://doi.org/10.1038/onc.2016.227>
- Cammarata, G. M., Bearce, E. A., & Lowery, L. A. (2017). *Cytoskeletal social networking in the growth cone: how +TIPs mediate microtubule-actin cross-linking to drive axon outgrowth and guidance*. *73*(9), 461–476. <https://doi.org/10.1002/cm.21272>. Cytoskeletal
- Carrier, M. F., Laurent, V., Santolini, J., Melki, R., Didry, D., Xia, G. X., Hong, Y., Chua, N. H., & Pantaloni, D. (1997). Actin depolymerizing factor (ADF/cofilin) enhances the rate of filament turnover: Implication in actin-based motility. *Journal of Cell Biology*, *136*(6), 1307–1322. <https://doi.org/10.1083/jcb.136.6.1307>
- Case and Waterman. (2015). Integration of actin dynamics and cell adhesion by a three-dimensional, mechanosensitive molecular clutch. *Nature Cell Biology*, *17*(8), 955–963. <https://doi.org/10.1038/ncb3191>. Integration
- Castellani, V., Chédotal, A., Schachner, M., Faivre-Sarrailh, C., & Rougon, G. (2000). Analysis of the L1-deficient mouse phenotype reveals cross-talk between Sema3A and L1 signaling pathways in axonal guidance. *Neuron*, *27*(2), 237–249. [https://doi.org/10.1016/S0896-6273\(00\)00033-7](https://doi.org/10.1016/S0896-6273(00)00033-7)
- Castellani, V., Falk, J., & Rougon, G. (2004). Semaphorin3A-induced receptor endocytosis during axon guidance responses is mediated by L1 CAM. *Molecular and Cellular Neuroscience*, *26*(1), 89–100. <https://doi.org/10.1016/j.mcn.2004.01.010>
- Castillo, C., Martinez, J. C., Longart, M., García, L., Hernández, M., Carballo, J., Rojas, H., Matteo, L., Casique, L., Escalona, J. L., Rodríguez, Y., Rodríguez, J., Hernández, D., Balbi, D., & Villegas, R. (2018). Extracellular Application of CRMP2 Increases Cytoplasmic Calcium through NMDA Receptors. *Neuroscience*, *376*, 204–223.

<https://doi.org/10.1016/j.neuroscience.2018.02.002>

- Catani, M., Howard, R. J., Pajevic, S., & Jones, D. K. (2002). Virtual in Vivo interactive dissection of white matter fasciculi in the human brain. *NeuroImage*, *17*(1), 77–94. <https://doi.org/10.1006/nimg.2002.1136>
- Cembrowski, M. S., Phillips, M. G., DiLisio, S. F., Shields, B. C., Winnubst, J., Chandrashekar, J., Bas, E., & Spruston, N. (2018). Dissociable Structural and Functional Hippocampal Outputs via Distinct Subiculum Cell Classes. *Cell*, *173*(5), 1280-1292.e18. <https://doi.org/10.1016/j.cell.2018.03.031>
- Cha, C., Zhang, J., Ji, Z., Tan, M., Li, S., Wu, F., Chen, K., Gong, S., Guo, G., & Lin, H. (2016). CRMP4 regulates dendritic growth and maturation via the interaction with actin cytoskeleton in cultured hippocampal neurons. *Brain Research Bulletin*, *124*, 286–294. <https://doi.org/10.1016/j.brainresbull.2016.06.008>
- Chadborn, N. H., Ahmed, A. I., Holt, M. R., Prinjha, R., Dunn, G. A., Jones, G. E., & Eickholt, B. J. (2006). PTEN couples Sema3A signalling to growth cone collapse. *Journal of Cell Science*, *119*(5), 951–957. <https://doi.org/10.1242/jcs.02801>
- Chamberlain, L. H., Burgoyne, R. D., & Gould, G. W. (2001). SNARE proteins are highly enriched in lipid rafts in PC12 cells: Implications for the spatial control of exocytosis. In *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* (Vol. 98, Issue 10). <https://doi.org/10.1073/pnas.091502398>
- Charrier, E., Reibel, S., Rogemond, V., Aguera, M., Thomasset, N., & Honnorat, J. (2003). Collapsin response mediator proteins (CRMPs): involvement in nervous system development and adult neurodegenerative disorders. *Molecular Neurobiology*, *28*(1), 51–64. <https://doi.org/10.1385/MN:28:1:51>
- Chauvet, S., Burk, K., & Mann, F. (2013). Navigation rules for vessels and neurons: cooperative signaling between VEGF and neural guidance cues. *Cell. Mol. Life Sci*, *70*. <https://doi.org/10.1007/s00018-013-1278-4>
- Chauvet, S., Cohen, S., Yoshida, Y., Fekrane, L., Livet, J., Gayet, O., Segu, L., Buhot, M. C., Jessell, T. M., Henderson, C. E., & Mann, F. (2007). Gating of Sema3E/PlexinD1 Signaling by Neuropilin-1 Switches Axonal Repulsion to Attraction during Brain Development. *Neuron*, *56*(5), 807–822. <https://doi.org/10.1016/j.neuron.2007.10.019>

- Chen, Y. C., Huang, H. R., Hsu, C. H., & Ou, C. Y. (2021). CRMP/UNC-33 organizes microtubule bundles for KIF5-mediated mitochondrial distribution to axon. *PLoS Genetics*, *17*(2). <https://doi.org/10.1371/JOURNAL.PGEN.1009360>
- Chi, X. X., Schmutzler, B. S., Brittain, J. M., Wang, Y., Hingtgen, C. M., Nicol, G. D., & Khanna, R. (2009). Regulation of N-type voltage-gated calcium channels (Cav2.2) and transmitter release by collapsin response mediator protein-2 (CRMP-2) in sensory neurons. *Journal of Cell Science*, *122*(Pt 23), 4351–4362. <https://doi.org/10.1242/jcs.053280>
- Chichili, G. R., & Rodgers, W. (2007). Clustering of membrane raft proteins by the actin cytoskeleton. *Journal of Biological Chemistry*, *282*(50), 36682–36691. <https://doi.org/10.1074/jbc.M702959200>
- Christiansen, K., Dillingham, C. M., Wright, N. F., Saunders, R. C., Vann, S. D., & Aggleton, J. P. (2016). Complementary subicular pathways to the anterior thalamic nuclei and mammillary bodies in the rat and macaque monkey brain. *European Journal of Neuroscience*, *43*(8), 1044–1061. <https://doi.org/10.1111/ejn.13208>
- Chua, J. Y., Ng, S. J., Yagensky, O., Wanker, E. E., & Chua, J. J. E. (2021). Fez1 forms complexes with crmp1 and dcc to regulate axon and dendrite development. *ENeuro*, *8*(2). <https://doi.org/10.1523/ENEURO.0193-20.2021>
- Clark, D., Dedova, I., Cordwell, S., & Matsumoto, I. (2006). A proteome analysis of the anterior cingulate cortex gray matter in schizophrenia. *Molecular Psychiatry*, *11*(5), 459–470. <https://doi.org/10.1038/sj.mp.4001806>
- Colavita, A., & Culotti, J. G. (1998). Suppressors of Ectopic UNC-5 Growth Cone Steering Identify Eight Genes Involved in Axon Guidance in *Caenorhabditis elegans*. In *DEVELOPMENTAL BIOLOGY* (Vol. 194).
- Cole, A. R., Causeret, F., Yadirgi, G., James Hastie, C., McLauchlan, H., McManus, E. J., Hernández, F., Eickholt, B. J., Nikolic, M., & Sutherland, C. (2006). Distinct Priming Kinases Contribute to Differential Regulation of Collapsin Response Mediator Proteins by Glycogen Synthase Kinase-3 in Vivo *,[unk]. In *J Biol Chem* (Vol. 281, Issue 24). <http://www.jbc.org>
- Cole, A. R., Knebel, A., Morrice, N. A., Robertson, L. A., Irving, A. J., Connolly, C. N., &

- Sutherland, C. (2004). GSK-3 phosphorylation of the Alzheimer epitope within collapsin response mediator proteins regulates axon elongation in primary neurons. *Journal of Biological Chemistry*, 279(48), 50176–50180. <https://doi.org/10.1074/jbc.C400412200>
- Cole, A. R., Noble, W., Aalten, L. Van, Plattner, F., Meimaridou, R., Hogan, D., Taylor, M., LaFrancois, J., Gunn-Moore, F., Verkhatsky, A., Oddo, S., Laferla, F., Giese, K. P., Dineley, K. T., Duff, K., Richardson, J. C., Yan, S. Du, Hanger, D. P., Allan, S. M., & Sutherland, C. (2007). Collapsin response mediator protein-2 hyperphosphorylation is an early event in Alzheimer's disease progression. *Journal of Neurochemistry*, 103(3), 1132–1144. <https://doi.org/10.1111/j.1471-4159.2007.04829.x>
- Cole, R. N., & Hart, G. W. (2001). Cytosolic O-glycosylation is abundant in nerve terminals. In *Journal of Neurochemistry*.
- Coles, C. H., & Bradke, F. (2015). Coordinating Neuronal Actin-Microtubule Dynamics. *Current Biology*, 25(15), R677–R691. <https://doi.org/10.1016/j.cub.2015.06.020>
- Conde and Cáceres. (2009). Microtubule assembly, organization and dynamics in axons and dendrites. *Nature Reviews Neuroscience*, 10(5), 319–332. <https://doi.org/10.1038/nrn2631>
- Cuveillier, C., Boulan, B., Ravanello, C., Denarier, E., Deloulme, J. C., Gory-Fauré, S., Delphin, C., Bosc, C., Arnal, I., & Andrieux, A. (2021). Beyond Neuronal Microtubule Stabilization: MAP6 and CRMPS, Two Converging Stories. *Frontiers in Molecular Neuroscience*, 14. <https://doi.org/10.3389/fnmol.2021.665693>
- De Bruin, J. P. C., Moita, M. P., De Brabander, H. M., & Joosten, R. N. J. M. A. (2001). Place and response learning of rats in a Morris water maze: Differential effects of fimbria fornix and medial prefrontal cortex lesions. *Neurobiology of Learning and Memory*, 75(2), 164–178. <https://doi.org/10.1006/nlme.2000.3962>
- Del Río, J. A., González-Billault, C., Ureña, J. M., Jiménez, E. M., Barallobre, M. J., Pascual, M., Pujadas, L., Simó, S., La Torre, A., Wandosell, F., Ávila, J., & Soriano, E. (2004). MAP1B is required for netrin 1 signaling in neuronal migration and axonal guidance. *Current Biology*, 14(10), 840–850. <https://doi.org/10.1016/j.cub.2004.04.046>
- Delloye-Bourgeois, C., Jacquier, A., Charoy, C., Reynaud, F., Nawabi, H., Thoinet, K., Kindbeiter, K., Yoshida, Y., Zagar, Y., Kong, Y., Jones, Y. E., Falk, J., Chédotal, A., &

- Castellani, V. (2015). PlexinA1 is a new Slit receptor and mediates axon guidance function of Slit C-terminal fragments. *Nature Neuroscience*, *18*(1), 36–45. <https://doi.org/10.1038/nn.3893>
- Delotterie, D., Ruiz, G., Brocard, J., Schweitzer, A., Roucard, C., Roche, Y., Suaud-Chagny, M. F., Bressand, K., & Andrieux, A. (2010). Chronic administration of atypical antipsychotics improves behavioral and synaptic defects of STOP null mice. *Psychopharmacology*, *208*(1), 131–141. <https://doi.org/10.1007/s00213-009-1712-3>
- Deloulme, J. C., Gory-Fauré, S., Mauconduit, F., Chauvet, S., Jonckheere, J., Boulan, B., Mire, E., Xue, J., Jany, M., Maucler, C., Deparis, A. A., Montigon, O., Daoust, A., Barbier, E. L., Bosc, C., Deglon, N., Brocard, J., Denarier, E., Le Brun, I., ... Andrieux, A. (2015). Microtubule-associated protein 6 mediates neuronal connectivity through Semaphorin 3E-dependent signalling for axonal growth. *Nature Communications*, *6*. <https://doi.org/10.1038/ncomms8246>
- Dent, E. W., Barnes, A. M., Tang, F., & Kalil, K. (2004). Netrin-1 and Semaphorin 3A Promote or Inhibit Cortical Axon Branching, Respectively, by Reorganization of the Cytoskeleton. *Journal of Neuroscience*, *24*(12), 3002–3012. <https://doi.org/10.1523/JNEUROSCI.4963-03.2004>
- Deo, R. C., Schmidt, E. F., Elhabazi, A., Togashi, H., Burley, S. K., & Strittmatter, S. M. (2004). Structural bases for CRMP function in plexin-dependent semaphorin3A signaling. *EMBO Journal*, *23*(1), 9–22. <https://doi.org/10.1038/sj.emboj.7600021>
- Dillingham, C. M., Erichsen, J. T., O'Mara, S. M., Aggleton, J. P., & Vann, S. D. (2015). Fornical and nonfornical projections from the rat hippocampal formation to the anterior thalamic nuclei. *Hippocampus*, *25*(9), 977–992. <https://doi.org/10.1002/hipo.22421>
- Ding, J. B., Oh, W. J., Sabatini, B. L., & Gu, C. (2012). Semaphorin 3Eg-Plexin-D1 signaling controls pathway-specific synapse formation in the striatum. *Nature Neuroscience*, *15*(2), 215–223. <https://doi.org/10.1038/nn.3003>
- Dominici, C., Antonio, J., #1, M.-B., Roig Puiggros, S., Rappeneau, Q., Rama, N., Vieugue, P., Bernet, A., Mehlen, P., & Chédotal, A. (2017). Floor plate-derived netrin-1 is dispensable for commissural axon guidance Europe PMC Funders Group. *Nature*, *545*(7654), 350–354. <https://doi.org/10.1038/nature22331>

- Douet, V., & Chang, L. (2015). Fornix as an imaging marker for episodic memory deficits in healthy aging and in various neurological disorders. *Frontiers in Aging Neuroscience*, 7(JAN), 1–19. <https://doi.org/10.3389/fnagi.2014.00343>
- Drees, F., & Gertler, F. B. (2008). Ena/VASP: proteins at the tip of the nervous system. In *Current Opinion in Neurobiology* (Vol. 18, Issue 1). <https://doi.org/10.1016/j.conb.2008.05.007>
- Dun, X. P., & Parkinson, D. B. (2017). Role of Netrin-1 signaling in nerve regeneration. *International Journal of Molecular Sciences*, 18(3). <https://doi.org/10.3390/ijms18030491>
- Dustrude, E. T., Perez-Miller, S., François-Moutal, L., Moutal, A., Khanna, M., & Khanna, R. (2017). SUMO on CRMPs - wrestling for pain? In *Channels* (Vol. 11, Issue 4, pp. 265–267). Taylor and Francis Inc. <https://doi.org/10.1080/19336950.2017.1311758>
- Dustrude, Erik T., Moutal, A., Yang, X., Wang, Y., Khanna, M., & Khanna, R. (2016). Hierarchical CRMP2 posttranslational modifications control NaV1.7 function. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 113(52), E8443–E8452. <https://doi.org/10.1073/pnas.1610531113>
- Dustrude, Erik T., Wilson, S. M., Ju, W., Xiao, Y., & Khanna, R. (2013). CRMP2 protein SUMOylation modulates NaV1.7 channel trafficking. *Journal of Biological Chemistry*, 288(34), 24316–24331. <https://doi.org/10.1074/jbc.M113.474924>
- Eichmann, A., Makinen, T., & Alitalo, K. (2005). Neural guidance molecules regulate vascular remodeling and vessel navigation. In *Genes and Development* (Vol. 19, Issue 9, pp. 1013–1021). <https://doi.org/10.1101/gad.1305405>
- Eickholt, B. J., Walsh, F. S., & Doherty, P. (2002). An inactive pool of GSK-3 at the leading edge of growth cones is implicated in Semaphorin 3A signaling. *Journal of Cell Biology*, 157(2), 211–217. <https://doi.org/10.1083/jcb.200201098>
- Eva, R., & Fawcett, J. (2014). Integrin signalling and traffic during axon growth and regeneration. *Current Opinion in Neurobiology*, 27, 179–185. <https://doi.org/10.1016/j.conb.2014.03.018>
- Fan, A., Tofangchi, A., Kandel, M., Popescu, G., & Saif, T. (2017). Coupled circumferential

- and axial tension driven by actin and myosin influences in vivo axon diameter. *Scientific Reports*, 7(1), 1–12. <https://doi.org/10.1038/s41598-017-13830-1>
- Feldeim, D., & O’Leary, D. (2010). Visual Map Development : Bidirectional and Competition. *Cold Spring Harbor Perspectives in Biology*, 2:a001768, 1–20.
- Fernández-Gamba, A., Leal, M. C., Maarouf, C. L., Richter-Landsberg, C., Wu, T., Morelli, L., Roher, A. E., & Castaño, E. M. (2012). Collapsin response mediator protein-2 phosphorylation promotes the reversible retraction of oligodendrocyte processes in response to non-lethal oxidative stress. *Journal of Neurochemistry*, 121(6), 985–995. <https://doi.org/10.1111/j.1471-4159.2012.07742.x>
- Fielding, C. J., & Fielding, P. E. (n.d.). *Cholesterol and caveolae: structural and functional relationships*. www.elsevier.com/locate/bba
- Finci, L. I., Krüger, N., Sun, Zhang, J., Chegkazi, M., Wu, Y., Schenk, G., Mertens, H. D. T., Svergun, D. I., Zhang, Y., Wang, J.-H., & Meijers, R. (2014). The crystal structure of netrin-1 in complex with DCC reveals the bi-functionality of netrin-1 as a guidance cue HHS Public Access. *Neuron*, 83(4), 839–849. <https://doi.org/10.1016/j.neuron.2014.07.010>
- Fitzsimmons, J., Hamoda, H. M., Swisher, T., Terry, D., Rosenberger, G., Seidman, L. J., Goldstein, J., Meshulam-Gately, R., Petryshen, T., Wojcik, J., Kikinis, R., & Kubicki, M. (2014). Diffusion tensor imaging study of the fornix in first episode schizophrenia and in healthy controls. *Schizophrenia Research*, 156(2–3), 157–160. <https://doi.org/10.1016/j.schres.2014.04.022>
- Fletcher, E., Raman, M., Huebner, P., Liu, A., Mungas, D., Carmichael, O., & Decarli, C. (2013). Loss of Fornix White Matter Volume as a Predictor of Cognitive Impairment in Cognitively Normal Elderly Individuals. *JAMA Neurol*, 70(11), 1389–1395. <https://doi.org/10.1001/jamaneurol.2013.3263>
- Flores, C. (2011). *Role of netrin-1 in the organization and function of the mesocorticolimbic dopamine system*. <https://doi.org/10.1503/jpn.100171>
- François-Moutal, L., Dustrude, E. T., Wang, Y., Brustovetsky, T., Dorame, A., Ju, W., Moutal, A., Perez-Miller†, S., Brustovetsky, N., Gokhale, V., Khanna, M., & Khanna, R. (2018). Inhibition of the Ubc9 E2 SUMO conjugating enzyme–CRMP2 interaction

- decreases NaV1.7 currents and reverses experimental neuropathic pain Liberty. In *Pain* (Vol. 176, Issue 1). <https://doi.org/10.1097/j.pain.0000000000001294>. Inhibition
- Frank, C., Rufini, S., Tancredi, V., Forcina, R., Grossi, D., & D'Arcangelo, G. (2008). Cholesterol depletion inhibits synaptic transmission and synaptic plasticity in rat hippocampus. *Experimental Neurology*, *212*(2), 407–414. <https://doi.org/10.1016/j.expneurol.2008.04.019>
- Frank, Claudio, Giammarioli, A. M., Pepponi, R., Fiorentini, C., & Rufini, S. (2004). Cholesterol perturbing agents inhibit NMDA-dependent calcium influx in rat hippocampal primary culture. *FEBS Letters*, *566*(1–3), 25–29. <https://doi.org/10.1016/j.febslet.2004.03.113>
- Franze, K. (2020). Integrating Chemistry and Mechanics: The Forces Driving Axon Growth. *Annual Review of Cell and Developmental Biology*, *36*, 61–83. <https://doi.org/10.1146/annurev-cellbio-100818-125157>
- Fukata, Y., Itoh, T. J., Kimura, T., Ménager, C., Nishimura, T., Shiromizu, T., Watanabe, H., Inagaki, N., Iwamatsu, A., Hotani, H., & Kaibuchi, K. (2002). CRMP-2 binds to tubulin heterodimers to promote microtubule assembly. *Nature Cell Biology*, *4*(8), 583–591. <https://doi.org/10.1038/ncb825>
- Gad, J. M., Keeling, S. L., Shu, T., Richards B A N D, L. J., & Cooper, H. M. (2000). *The Spatial and Temporal Expression Patterns of Netrin Receptors, DCC and Neogenin, in the Developing Mouse Retina*. <https://doi.org/10.1006/exer.2000.0823>
- Gallo, G., & Letourneau, P. C. (2004). Regulation of Growth Cone Actin Filaments by Guidance Cues. *Journal of Neurobiology*, *58*(1), 92–102. <https://doi.org/10.1002/neu.10282>
- Gao, X., Zhang, J., & Schmid, S. L. (2008). Spatiotemporal Analysis of Differential Akt Regulation in Plasma Membrane Microdomains. *Molecular Biology of the Cell*, *19*, 4366–4373. <https://doi.org/10.1091/mbc.E08>
- Gavazzi, I. (2001). Semaphorin-neuropilin-1 interactions in plasticity and regeneration of adult neurons. In *Cell and Tissue Research* (Vol. 305, Issue 2, pp. 275–284). <https://doi.org/10.1007/s004410100365>

- George, K. S., & Wu, S. (2012). Lipid raft: A floating island of death or survival. *Toxicology and Applied Pharmacology*, 259(3), 311–319. <https://doi.org/10.1016/j.taap.2012.01.007>
- Gimenez, U., Boulan, B., Mauconduit, F., Taurel, F., Leclercq, M., Denarier, E., Brocard, J., Gory-Fauré, S., Andrieux, A., Lahrech, H., & Deloulme, J. C. (2017). 3D imaging of the brain morphology and connectivity defects in a model of psychiatric disorders: MAP6-KO mice. *Scientific Reports*, 7(1). <https://doi.org/10.1038/s41598-017-10544-2>
- Gimpl, G., & Gehrig-Burger, K. (2007). Cholesterol reporter molecules. In *Bioscience Reports* (Vol. 27, Issue 6, pp. 335–358). <https://doi.org/10.1007/s10540-007-9060-1>
- Gimpl, G., & Gehrig-Burger, K. (2011). Probes for studying cholesterol binding and cell biology. In *Steroids* (Vol. 76, Issue 3, pp. 216–231). <https://doi.org/10.1016/j.steroids.2010.11.001>
- Ginés, S., Ginés, G., Ciruela, F., Burgueño, J., Burgueño, B., Casad'o, V., Casad'o, C., Canela, E. I., Mallol, J., Llu'is, C., Llu'is, L., & Franco, R. (2001). *Involvement of Caveolin in Ligand-Induced Recruitment and Internalization of A 1 Adenosine Receptor and Adenosine Deaminase in an Epithelial Cell Line*. <http://molpharm.aspetjournals.org>
- Girouard, M. P., Simas, T., Hua, L., Morquette, B., Khazaei, M. R., Unsain, N., Johnstone, A. D., Rambaldi, I., Sanz, R. L., Raddo, M. E. Di, Gamage, K. K., Yong, Y., Willis, D. E., Verge, V. M. K., Barker, P. A., Deppmann, C., & Fournier, A. E. (2020). Collapsin response mediator protein 4 (Crmp4) facilitates wallerian degeneration and axon regeneration following sciatic nerve injury. *ENeuro*, 7(2). <https://doi.org/10.1523/ENEURO.0479-19.2020>
- Goley and Welsch. (2006). The ARP2/3 complex: An actin nucleator comes of age. *Nature Reviews Molecular Cell Biology*, 7(10), 713–726. <https://doi.org/10.1038/nrm2026>
- Goñi, F. M. (2019). “Rafts”: A nickname for putative transient nanodomains. In *Chemistry and Physics of Lipids* (Vol. 218, pp. 34–39). Elsevier Ireland Ltd. <https://doi.org/10.1016/j.chemphyslip.2018.11.006>
- Goodman, C. ., Kolodkin, A. ., Luo, Y., Püschel, A. ., & Raper, J. . (1999). Unified Nomenclature for the Semaphorins/Collapsins. In *Cell* (Vol. 97, pp. 551–552).
- Goshima, Y., Nakamura, F., Strittmatter, P., & Strlttmattert, S. M. (1995). Collapsin-induced

growth cone collapse mediated by an intracellular protein related to UNC-33. In *Nature* (Vol. 55, Issue 6).

Grider, M. H., Park, D., Spencer, D. M., & Shine, H. D. (2009). Lipid raft-targeted Akt promotes axonal branching and growth cone expansion via mTOR and Rac1, respectively. *Journal of Neuroscience Research*, 87(14), 3033–3042.
<https://doi.org/10.1002/jnr.22140>

Gu, C., Yoshida, Y., Livet, J., Reimert, D. V., Mann, F., Merte, J., Henderson, C. E., Jessell, T. M., Kolodkin, A. L., & Ginty, D. D. (2005). Semaphorin 3E and plexin-D1 control vascular pattern independently of neuropilins. In *Science* (Vol. 307, Issue 5707, pp. 265–268). <https://doi.org/10.1126/science.1105416>

Guirland, C., Suzuki, S., Kojima, M., Lu, B., & Zheng, J. Q. (2004). Lipid Rafts Mediate Chemotropic Guidance of Nerve Growth Cones will not only enhance our understanding of brain development but also provide potential strategies to combat growth inhibition of regenerating nerve fibers. For. In *Neuron* (Vol. 42).

Hall, A., & Lalli, G. (2010). Rho and Ras GTPases in axon growth, guidance, and branching. *Cold Spring Harbor Perspectives in Biology*, 2(2), 1–18.
<https://doi.org/10.1101/cshperspect.a001818>

Hall, J., Trent, S., Thomas, K. L., O'Donovan, M. C., & Owen, M. J. (2015). Genetic risk for schizophrenia: Convergence on synaptic pathways involved in plasticity. In *Biological Psychiatry* (Vol. 77, Issue 1, pp. 52–58). Elsevier Inc.
<https://doi.org/10.1016/j.biopsych.2014.07.011>

Hamajima, N., Matsuda, K., Sakata, S., Tamaki Makoto Sasaki, N., & Nonaka, M. (1996). A novel gene family defined by human dihydropyrimidinase and three related proteins with differential tissue distribution. In *Gene* (Vol. 180).

Hansen, G. H., Niels-Christiansen, L.-L., Thorsen, E., Immerdal, L., & Danielsen, E. M. (2000). *Cholesterol Depletion of Enterocytes EFFECT ON THE GOLGI COMPLEX AND APICAL MEMBRANE TRAFFICKING**. <http://www.jbc.org/>

Harder, T., Scheiffele, P., Verkade, P., & Simons, K. (1998). Lipid Domain Structure of the Plasma Membrane Revealed by Patching of Membrane Components. In *The Journal of Cell Biology* (Vol. 141, Issue 4). <http://www.jcb.org>

- Hartley, J. M., Chu, T. W., Peterson, E. M., Zhang, R., Yang, J., Harris, J., & Kopeček, J. (2015). Super-Resolution Imaging and Quantitative Analysis of Membrane Protein/Lipid Raft Clustering Mediated by Cell-Surface Self-Assembly of Hybrid Nanoconjugates. *ChemBioChem*, *16*(12), 1725–1729. <https://doi.org/10.1002/cbic.201500278>
- Hattori, D., Demir, E., Won Kim, H., Viragh, E., Lawrence Zipursky, S., Dickson, B. J., & Bjd, S. (2007). *Dscam diversity is essential for neuronal wiring and self-recognition*. www.nature.com/nature.
- Hattori, T., Sato, R., Aoki, S., Yuasa, T., & Mizusawa, H. (2012). Different patterns of fornix damage in idiopathic normal pressure hydrocephalus and Alzheimer disease. *American Journal of Neuroradiology*, *33*(2), 274–279. <https://doi.org/10.3174/ajnr.A2780>
- Head, B. P., Patel, H. H., & Insel, P. A. (2014). Interaction of membrane/lipid rafts with the cytoskeleton: Impact on signaling and function: Membrane/lipid rafts, mediators of cytoskeletal arrangement and cell signaling. In *Biochimica et Biophysica Acta - Biomembranes* (Vol. 1838, Issue 2, pp. 532–545). Elsevier B.V. <https://doi.org/10.1016/j.bbamem.2013.07.018>
- Hérincs, Z., Corset, V., Cahuzac, N., Furne, C., Castellani, V., Hueber, A. O., & Mehlen, P. (2005). DCC association with lipid rafts is required for netrin-1-mediated axon guidance. *Journal of Cell Science*, *118*(8), 1687–1692. <https://doi.org/10.1242/jcs.02296>
- Hering, H., Lin, C.-C., & Sheng, M. (2003). *Lipid Rafts in the Maintenance of Synapses, Dendritic Spines, and Surface AMPA Receptor Stability*.
- Higurashi, M., Iketani, M., Takei, K., Yamashita, N., Aoki, R., Kawahara, N., & Goshima, Y. (2012). Localized role of CRMP1 and CRMP2 in neurite outgrowth and growth cone steering. *Developmental Neurobiology*, *72*(12), 1528–1540. <https://doi.org/10.1002/dneu.22017>
- Hill, M. J., Donocik, J. G., Nuamah, R. A., Mein, C. A., Sainz-Fuertes, R., & Bray, N. J. (2014). Transcriptional consequences of schizophrenia candidate miR-137 manipulation in human neural progenitor cells. *Schizophrenia Research*, *153*(1–3), 225–230. <https://doi.org/10.1016/j.schres.2014.01.034>
- Hou, S. T., Jiang, S. X., Aylsworth, A., Ferguson, G., Slinn, J., Hu, H., Leung, T., Kappler, J., & Kaibuchi, K. (2009). CaMKII phosphorylates collapsin response mediator protein 2

- and modulates axonal damage during glutamate excitotoxicity. *Journal of Neurochemistry*, *111*(3), 870–881. <https://doi.org/10.1111/j.1471-4159.2009.06375.x>
- Hsieh, S. H. K., Ferraro, G. B., & Fournier, A. E. (2006). Myelin-associated inhibitors regulate cofilin phosphorylation and neuronal inhibition through LIM kinase and slingshot phosphatase. *Journal of Neuroscience*, *26*(3), 1006–1015. <https://doi.org/10.1523/JNEUROSCI.2806-05.2006>
- Hu, S., & Zhu, L. (2018). Semaphorins and Their Receptors: From Axonal Guidance to Atherosclerosis. *Frontiers in Physiology*, *9*. <https://doi.org/10.3389/fphys.2018.01236>
- Huang, H., Yang, T., Shao, Q., Majumder, T., Mell, K., & Liu, G. (2018). Human TUBB3 Mutations Disrupt Netrin Attractive Signaling. *Neuroscience*, *374*, 155–171. <https://doi.org/10.1016/j.neuroscience.2018.01.046>
- Huber, A. B., Kolodkin, A. L., Ginty, D. D., & Cloutier, J. F. (2003). Signaling at the growth cone: Ligand-receptor complexes and the control of axon growth and guidance. *Annual Review of Neuroscience*, *26*, 509–563. <https://doi.org/10.1146/annurev.neuro.26.010302.081139>
- Inagaki, N., Chihara, K., Arimura, N., Ménager, C., Kawano, Y., Matsuo, N., Nishimura, T., Amano, M., & Kaibuchi, K. (2001). CRMP-2 induces axons in cultured hippocampal neurons. *Nature Neuroscience*, *4*(8), 781–782. <https://doi.org/10.1038/90476>
- Inatome, R., Tsujimura, T., Hitomi, T., Mitsui, N., Hermann, P., Kuroda, ichi, Yamamura, H., & Yanagi, S. (2000). Identification of CRAM, a Novel unc-33 Gene Family Protein That Associates with CRMP3 and Protein-tyrosine Kinase(s) in the Developing Rat Brain*. <https://doi.org/10.1074/jbc.M910126199>
- Islam, S. M., Shinmyo, Y., Okafuji, T., Su, Y., Naser, I. Bin, Ahmed, G., Zhang, S., Chen, S., Ohta, K., Kiyonari, H., Abe, T., Tanaka, S., Nishinakamura, R., Terashima, T., Kitamura, T., & Tanaka, H. (2009). Draxin, a repulsive guidance protein for spinal cord and forebrain commissures. *Science*, *323*(5912), 388–393. <https://doi.org/10.1126/science.1165187>
- Isono, T., Yamashita, N., Obara, M., Araki, T., Nakamura, F., Kamiya, Y., Alkam, T., Nitta, A., Nabeshima, T., Mikoshiba, K., Ohshima, T., & Goshima, Y. (2013). Amyloid- β 25-35 induces impairment of cognitive function and long-term potentiation through

- phosphorylation of collapsin response mediator protein 2. *Neuroscience Research*, 77(3), 180–185. <https://doi.org/10.1016/j.neures.2013.08.005>
- Ito, T., Kagoshima, M., Sasaki, Y., Li, C., Udaka, N., Kitsukawa, T., Fujisawa, H., Taniguchi, M., Yagi, T., Kitamura, H., & Goshima, Y. (2000). *Repulsive axon guidance molecule Sema3A inhibits branching morphogenesis of fetal mouse lung*. www.elsevier.com/locate/modo
- Ito, Y., Oinuma, I., Katoh, H., Kaibuchi, K., & Negishi, M. (2006). Sema4D/plexin-B1 activates GSK-3 β through R-Ras GAP activity, inducing growth cone collapse. *EMBO Reports*, 7(7), 704–709. <https://doi.org/10.1038/sj.embor.7400737>
- Jang, S. Y., Shin, Y. K., Jung, J., Lee, S. H., Seo, S. Y., Suh, D. J., & Park, H. T. (2010). Injury-induced CRMP4 expression in adult sensory neurons; a possible target gene for ciliary neurotrophic factor. *Neuroscience Letters*, 485(1), 37–42. <https://doi.org/10.1016/j.neulet.2010.08.058>
- Jankowski, M. M., Nurul Islam, M., Wright, N. F., Vann, S. D., Erichsen, J. T., Aggleton, J. P., & O, S. M. (2014). *Nucleus reuniens of the thalamus contains head direction cells*. 3, 3075. <https://doi.org/10.7554/eLife.03075>
- Ji, Y., Hu, Y., Ren, J., Khanna, R., Yao, Y., Chen, Y., Li, Q., & Sun, L. (2019). CRMP2-derived peptide ST2-104 (R9-CBD3) protects SH-SY5Y neuroblastoma cells against A β 25-35 -induced neurotoxicity by inhibiting the pCRMP2/NMDAR2B signaling pathway. *Chemico-Biological Interactions*, 305(March), 28–39. <https://doi.org/10.1016/j.cbi.2019.03.005>
- Jiang, S. X., Kappler, J., Zurakowski, B., Desbois, A., Aylsworth, A., & Hou, S. T. (2007). Calpain cleavage of collapsin response mediator proteins in ischemic mouse brain. *European Journal of Neuroscience*, 26(4), 801–809. <https://doi.org/10.1111/j.1460-9568.2007.05715.x>
- Jiang, T., Zhang, G., Liang, Y., Cai, Z., Liang, Z., Lin, H., & Tan, M. (2020). PlexinA3 Interacts with CRMP2 to Mediate Sema3A Signalling During Dendritic Growth in Cultured Cerebellar Granule Neurons. *Neuroscience*, 434, 83–92. <https://doi.org/10.1016/j.neuroscience.2020.02.008>
- Johansson, K., Tornngren, M., Wasselius, J., Mansson, L., & Ehinger, B. (2001).

- Developmental expression of DCC in the rat retina. In *Developmental Brain Research* (Vol. 130). www.elsevier.com/locate/bres
- Joly, S., Jordi, N., Schwab, M. E., & Pernet, V. (2014). The Ephrin receptor EphA4 restricts axonal sprouting and enhances branching in the injured mouse optic nerve. *European Journal of Neuroscience*, *40*(7), 3021–3031. <https://doi.org/10.1111/ejn.12677>
- Jones, C., Watson, D., & Fone, K. (2011). Animal models of schizophrenia. In *British Journal of Pharmacology* (Vol. 164, Issue 4, pp. 1162–1194). Wiley-Blackwell. <https://doi.org/10.1111/j.1476-5381.2011.01386.x>
- Jones, S. B., Lu, H. Y., & Lu, Q. (2004). Abl tyrosine kinase promotes dendrogenesis by inducing actin cytoskeletal rearrangements in cooperation with Rho family small GTPases in hippocampal neurons. *Journal of Neuroscience*, *24*(39), 8510–8521. <https://doi.org/10.1523/JNEUROSCI.1264-04.2004>
- Ju, W., Li, Q., Wilson, S. M., Brittain, J. M., Meroueh, L., & Khanna, R. (2013). SUMOylation alters CRMP2 regulation of calcium influx in sensory neurons. *Channels*, *7*(3), 153–159. <https://doi.org/10.4161/chan.24224>
- Julien, F., Bechara, A., Fiore, R., Nawabi, H., Zhou, H., Hoyo-Becerra, C., Bozon, M., Rougon, G., Grumet, M., Püschel, A. W., Sanes, J. R., & Castellani, V. (2005). Dual functional activity of semaphorin 3B is required for positioning the anterior commissure. *Neuron*, *48*(1), 63–75. <https://doi.org/10.1016/j.neuron.2005.08.033>
- Kadison, S. R., Mäkinen, T., Klein, R., Henkemeyer, M., & Kaprielian, Z. (2006). EphB receptors and ephrin-B3 regulate axon guidance at the ventral midline of the embryonic mouse spinal cord. *Journal of Neuroscience*, *26*(35), 8909–8914. <https://doi.org/10.1523/JNEUROSCI.1569-06.2006>
- Kahn, O. I., & Baas, P. W. (2017). Microtubules and Growth Cones: Motors Drive the Turn. *Trends in Neurosciences*, *39*(7), 433–440. <https://doi.org/10.1016/j.tins.2016.04.009>
- Kamata, T., Subleski, M., Hara, Y., Yuhki, N., Kung, H. fu, Copeland, N. G., Jenkins, N. A., Yoshimura, T., Modi, W., & Copeland, T. D. (1998). Isolation and characterization of a bovine neural specific protein (CRMP-2) cDNA homologous to unc-33, a *C. elegans* gene implicated in axonal outgrowth and guidance. *Molecular Brain Research*, *54*(2), 219–236. [https://doi.org/10.1016/S0169-328X\(97\)00332-X](https://doi.org/10.1016/S0169-328X(97)00332-X)

- Kamiguchi, H. (2006). The region-specific activities of lipid rafts during axon growth and guidance. In *Journal of Neurochemistry* (Vol. 98, Issue 2, pp. 330–335).
<https://doi.org/10.1111/j.1471-4159.2006.03888.x>
- Kapitein, L. C., & Hoogenraad, C. C. (2015). Building the Neuronal Microtubule Cytoskeleton. *Neuron*, 87(3), 492–506. <https://doi.org/10.1016/j.neuron.2015.05.046>
- Kasahara, K., Watanabe, K., Takeuchi, K., Kaneko, H., Oohira, A., Yamamoto, T., & Sanai, Y. (2000). Involvement of gangliosides in glycosylphosphatidylinositol-anchored neuronal cell adhesion molecule TAG-1 signaling in lipid rafts. *Journal of Biological Chemistry*, 275(44), 34701–34709. <https://doi.org/10.1074/jbc.M003163200>
- Kasai, K., McCarley, R. W., Salisbury, D. F., Onitsuka, T., Demeo, S., Yurgelun-Todd, D., Kikinis, R., Jolesz, F. A., & Shenton, M. E. (2004). Cavum septi pellucidi in first-episode schizophrenia and first-episode affective psychosis: An MRI study. *Schizophrenia Research*, 71(1), 65–76. <https://doi.org/10.1016/j.schres.2003.12.010>
- Kato, Y., Hamajima, N., Inagaki, H., Okamura, N., Koji, T., Sasaki, M., & Nonaka, M. (1998). Post-Meiotic Expression of the Mouse Dihydropyrimidinase-Related Protein 3 (DRP-3) Gene During Spermiogenesis. In *Mol. Reprod. Dev* (Vol. 51).
- Kawano, Y., Yoshimura, T., Tsuboi, D., Kawabata, S., Kaneko-Kawano, T., Shirataki, H., Takenawa, T., & Kaibuchi, K. (2005). CRMP-2 Is Involved in Kinesin-1-Dependent Transport of the Sra-1/WAVE1 Complex and Axon Formation. *Molecular and Cellular Biology*, 25(22), 9920–9935. <https://doi.org/10.1128/mcb.25.22.9920-9935.2005>
- Keino-Masu, K., Masu, M., Hinck, L., & David Leonardo, E. (1996). Deleted in Colorectal Cancer (DCC) Encodes a Netrin Receptor. In *Cell* (Vol. 87).
- Keleman, K., & Dickson, B. J. (2001). Short-and Long-Range Repulsion by the Drosophila Unc5 Netrin Receptor served regions: a ZU5 domain (also found in Zonula Occludens-1; Schultz et al and a carboxy-terminal death domain (DD). In *Neuron* (Vol. 32).
- Keller, P., & Simons, K. (1998). Cholesterol Is Required for Surface Transport of Influenza Virus Hemagglutinin. In *The Journal of Cell Biology* (Vol. 140, Issue 6).
<http://www.jcb.org>
- Khazaei, M. R., Girouard, M. P., Alchini, R., Tone, S. O., Shimada, T., Bechstedt, S., Cowan,

- M., Guillet, D., Wiseman, P. W., Brouhard, G., Cloutier, J. F., & Fournier, A. E. (2014). Collapsin response mediator protein 4 regulates growth cone dynamics through the actin and microtubule cytoskeleton. *Journal of Biological Chemistry*, 289(43), 30133–30143. <https://doi.org/10.1074/jbc.M114.570440>
- Kim, M., Farmer, W. T., Bjorke, B., McMahon, S. A., Fabre, P. J., Charron, F., & Mastick, G. S. (2014). Pioneer midbrain longitudinal axons navigate using a balance of Netrin attraction and Slit repulsion. *Neural Development*, 9(1). <https://doi.org/10.1186/1749-8104-9-17>
- Kimura, T., Arimura, N., Fukata, Y., Watanabe, H., Iwamatsu, A., & Kaibuchi, K. (2005). Tubulin and CRMP-2 complex is transported via Kinesin-1. *Journal of Neurochemistry*, 93(6), 1371–1382. <https://doi.org/10.1111/j.1471-4159.2005.03063.x>
- Kinnavane, L., Vann, S. D., Nelson, A. J. D., O'Mara, S. M., & Aggleton, J. P. (2018). Collateral projections innervate the mammillary bodies and retrosplenial cortex: A new category of hippocampal cells. *ENeuro*, 5(1), 1–14. <https://doi.org/10.1523/ENEURO.0383-17.2018>
- Kitamura, K., Takayama, M., Hamajima, N., Nakanishi, M., Sasaki, M., Endo, Y., Takemoto, T., Kimura, H., Iwaki, M., & Nonaka, M. (1999). Characterization of the Human Dihydropyrimidinase-Related Protein 2 (DRP-2) Gene. In *DNA RESEARCH* (Vol. 6). <https://academic.oup.com/dnaresearch/article-abstract/6/5/291/353934>
- Korade, Z., & Kenworthy, A. K. (2008). Lipid rafts, cholesterol, and the brain. In *Neuropharmacology* (Vol. 55, Issue 8, pp. 1265–1273). <https://doi.org/10.1016/j.neuropharm.2008.02.019>
- Korematsu, K., Hori, T., Morioka, M., & Kuratsu, J. ichi. (2010). Memory impairment due to a small unilateral infarction of the fornix. *Clinical Neurology and Neurosurgery*, 112(2), 164–166. <https://doi.org/10.1016/j.clineuro.2009.10.016>
- Koshiyama, D., Fukunaga, M., Okada, N., Morita, K., Nemoto, K., Usui, K., Yamamori, H., Yasuda, Y., Fujimoto, M., Kudo, N., Azechi, H., Watanabe, Y., Hashimoto, N., Narita, H., Kusumi, I., Ohi, K., Shimada, T., Kataoka, Y., Yamamoto, M., ... Hashimoto, R. (2020). White matter microstructural alterations across four major psychiatric disorders: mega-analysis study in 2937 individuals. *Molecular Psychiatry*, 25(4), 883–895.

<https://doi.org/10.1038/s41380-019-0553-7>

- Kowara, R., Chen, Q., Milliken, M., & Chakravarthy, B. (2005). Calpain-mediated truncation of dihydropyrimidinase-like 3 protein (DPYSL3) in response to NMDA and H₂O₂ toxicity. *Journal of Neurochemistry*, *95*(2), 466–474. <https://doi.org/10.1111/j.1471-4159.2005.03383.x>
- Krämer, E. M., Klein, C., Koch, T., Boytinck, M., & Trotter, J. (1999). Compartmentation of Fyn kinase with glycosylphosphatidylinositol- anchored molecules in oligodendrocytes facilitates kinase activation during myelination. In *Journal of Biological Chemistry* (Vol. 274, Issue 41). <https://doi.org/10.1074/jbc.274.41.29042>
- Kubo, T., Endo, M., Hata, K., Taniguchi, J., Kitajo, K., Tomura, S., Yamaguchi, A., Mueller, B. K., & Yamashita, T. (2008). Myosin IIA is required for neurite outgrowth inhibition produced by repulsive guidance molecule. *Journal of Neurochemistry*, *105*(1), 113–126. <https://doi.org/10.1111/j.1471-4159.2007.05125.x>
- Kubo, Y., Baba, K., Toriyama, M., Minegishi, T., Sugiura, T., Kozawa, S., Ikeda, K., & Inagaki, N. (2015). Shootin1-cortactin interaction mediates signal-force transduction for axon outgrowth. *Journal of Cell Biology*, *210*(4), 663–676. <https://doi.org/10.1083/jcb.201505011>
- Kuhn, T. B., Meberg, P. J., Brown, M. D., Bernstein, B. W., Minamide, L. S., Jensen, J. R., Okada, K., Soda, E. A., & Bamburg, J. R. (2000). Substrate-cytoskeletal coupling as a mechanism for the regulation of growth cone motility and guidance. *Journal of Neurobiology*, *44*(2), 97–113. [https://doi.org/10.1002/1097-4695\(200008\)44:2<97::AID-NEU2>3.0.CO;2-U](https://doi.org/10.1002/1097-4695(200008)44:2<97::AID-NEU2>3.0.CO;2-U)
- Kwiatkowska, K., Matveichuk, O. V., Fronk, J., & Ciesielska, A. (2020). Flotillins: At the intersection of protein S-palmitoylation and lipid-mediated signaling. *International Journal of Molecular Sciences*, *21*(7), 1–26. <https://doi.org/10.3390/ijms21072283>
- Labrecque, L., Royal, I., Surprenant, D. S., Patterson, C., Gingras, D., & Béliveau, R. (2003). Regulation of vascular endothelial growth factor receptor-2 activity by caveolin-1 and plasma membrane cholesterol. *Molecular Biology of the Cell*, *14*(1), 334–347. <https://doi.org/10.1091/mbc.E02-07-0379>
- Laube, B., Kuhse, J., & Betz, H. (1998). *Evidence for a Tetrameric Structure of Recombinant*

NMDA Receptors.

- Lawal, M., Olotu, F. A., & Soliman, M. E. S. (2018). Across the blood-brain barrier: Neurotherapeutic screening and characterization of naringenin as a novel CRMP-2 inhibitor in the treatment of Alzheimer's disease using bioinformatics and computational tools. *Computers in Biology and Medicine*, 98, 168–177.
<https://doi.org/10.1016/j.compbio.2018.05.012>
- Ledesma, M. D., Simons, K., & Dotti, C. G. (1998). Neuronal polarity: Essential role of protein-lipid complexes in axonal sorting. In *Neurobiology* (Vol. 95). www.pnas.org.
- Lee, H., Joo, J., Nah, S. S., Kim, J. W., Kim, H. K., Kwon, J. T., Lee, H. Y., Kim, Y. O., & Kim, H. J. (2015). Changes in Dpysl2 expression are associated with prenatally stressed rat offspring and susceptibility to schizophrenia in humans. *International Journal of Molecular Medicine*, 35(6), 1574–1586. <https://doi.org/10.3892/ijmm.2015.2161>
- Leoutsakos, J. M. S., Yan, H., Anderson, W. S., Asaad, W. F., Baltuch, G., Burke, A., Chakravarty, M. M., Drake, K. E., Foote, K. D., Fosdick, L., Giacobbe, P., Mari, Z., McAndrews, M. P., Munro, C. A., Oh, E. S., Okun, M. S., Pendergrass, J. C., Ponce, F. A., Rosenberg, P. B., ... Lyketsos, C. G. (2018). Deep Brain Stimulation Targeting the Fornix for Mild Alzheimer Dementia (the ADvance Trial): A Two Year Follow-up Including Results of Delayed Activation. *Journal of Alzheimer's Disease*, 64(2), 597–606. <https://doi.org/10.3233/JAD-180121>
- Leung, T., Ng, Y., Cheong, A., Ng, C. H., Tan, I., Hall, C., & Lim, L. (2002). *p80 ROKK binding protein is a novel splice variant of CRMP-1 which associates with CRMP-2 and modulates RhoA-induced neuronal morphology.*
- Levental, I., Levental, K. R., & Heberle, F. A. (2020). Lipid Rafts: Controversies Resolved, Mysteries Remain. *Trends in Cell Biology*, 30(5), 341–353.
<https://doi.org/10.1016/j.tcb.2020.01.009>
- Li, A., Zhu, H. M., Chen, Y., Yan, F., Liu, Z. Y., Li, Z. L., Dong, W. R., Zhang, L., & Wang, H. H. (2021). Cdc42 Facilitates Axonogenesis by Enhancing Microtubule Stabilization in Primary Hippocampal Neurons. *Cellular and Molecular Neurobiology*.
<https://doi.org/10.1007/s10571-021-01051-0>
- Li, C., Jiang, W., Hu, Q., Li, L. cheng, Dong, L., Chen, R., Zhang, Y., Tang, Y., Brantley

- Thrasher, J., Liu, C. B., & Li, B. (2016). Enhancing DPYSL3 gene expression via a promoter-targeted small activating RNA approach suppresses cancer cell motility and metastasis. *Oncotarget*, 7(16), 22893–22910. <https://doi.org/10.18632/oncotarget.8290>
- Li, C., Xu, H., Xiao, L., Zhu, H., Zhang, G., Wei, W., Li, K., Cao, X., Shen, D., Holzbeierlein, J., & Li, B. (2018). CRMP4a suppresses cell motility by sequestering RhoA activity in prostate cancer cells. *Cancer Biology and Therapy*, 19(12), 1193–1203. <https://doi.org/10.1080/15384047.2018.1491507>
- Li, L., Song, H., Mu, P., Xu, M., Liu, C., Wang, Y., Qin, Y., Sun, S., Gao, J., Wang, T., & Gao, D. (2017). The actin cytoskeleton is involved in glial cell line-derived neurotrophic factor (GDNF)-induced ret translocation into lipid rafts in dopaminergic neuronal cells. *International Journal of Molecular Sciences*, 18(9). <https://doi.org/10.3390/ijms18091922>
- Limoni, G. (2021). *Molecular Sciences Modelling and Refining Neuronal Circuits with Guidance Cues: Involvement of Semaphorins*. <https://doi.org/10.3390/ijms22116111>
- Lin, B., Li, Y., Wang, T., Qiu, Y., Chen, Z., Zhao, K., & Lu, N. (2020). CRMP2 is a therapeutic target that suppresses the aggressiveness of breast cancer cells by stabilizing RECK. *Oncogene*, 39(37), 6024–6040. <https://doi.org/10.1038/s41388-020-01412-x>
- Lin, P. C., Chan, P. M., Hall, C., & Manser, E. (2011). Collapsin response mediator proteins (CRMPs) are a new class of microtubule-associated protein (MAP) that selectively interacts with assembled microtubules via a taxol-sensitive binding interaction. *Journal of Biological Chemistry*, 286(48), 41466–41478. <https://doi.org/10.1074/jbc.M111.283580>
- Lisanti, M. P., Sargiacomo, M., Graeve, L., Saltiel, A. R., & Rodriguez-Boulan, E. (1988). Polarized apical distribution of glycosyl-phosphatidylinositol-anchored proteins in a renal epithelial cell line. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 85(24), 9557–9561. <https://doi.org/10.1073/pnas.85.24.9557>
- Liz, M. A., Mar, F. M., Santos, T. E., Pimentel, H. I., Marques, A. M., Morgado, M. M., Vieira, S., Sousa, V. F., Pemble, H., Wittmann, T., Sutherland, C., Woodgett, J. R., & Sousa, M. M. (2014). Neuronal deletion of GSK3 β increases microtubule speed in the growth cone and enhances axon regeneration via CRMP-2 and independently of MAP1B

- and CLASP2. *BMC Biology*, 12(1). <https://doi.org/10.1186/1741-7007-12-47>
- Lowery and Van Vactor. (2009). The trip of the tip: understanding the growth cone machinery. *Nature Reviews Molecular Cell Biology*.
<https://doi.org/10.1038/nrm2679>.The
- Luo, Y., Raible, D., & Raper, J. A. (1993). Collapsin: A Protein in Brain That Induces the Collapse and Paralysis of Neuronal Growth Cones. In *Cell* (Vol. 75).
- Ma, L., & Tessier-Lavigne, M. (2007). Dual branch-promoting and branch-repelling actions of Slit/Robo signaling on peripheral and central branches of developing sensory axons. *Journal of Neuroscience*, 27(25), 6843–6851.
<https://doi.org/10.1523/JNEUROSCI.1479-07.2007>
- Maciver, S. K. (1998). How ADF/cofilin depolymerizes actin filaments. *Current Opinion in Cell Biology*, 10(1), 140–144. [https://doi.org/10.1016/S0955-0674\(98\)80097-5](https://doi.org/10.1016/S0955-0674(98)80097-5)
- Mack, T. G. A., Koester, M. P., & Pollerberg, G. E. (2000). The microtubule-associated protein MAP1B is involved in local stabilization of turning growth cones. *Molecular and Cellular Neurosciences*, 15(1), 51–65. <https://doi.org/10.1006/mcne.1999.0802>
- Majava, V., Löytynoja, N., Chen, W. Q., Lubec, G., & Kursula, P. (2008). Crystal and solution structure, stability and post-translational modifications of collapsin response mediator protein 2. *FEBS Journal*, 275(18), 4583–4596. <https://doi.org/10.1111/j.1742-4658.2008.06601.x>
- Makihara, H., Nakai, S., Ohkubo, W., Yamashita, N., Nakamura, F., Kiyonari, H., Shioi, G., Jitsuki-Takahashi, A., Nakamura, H., Tanaka, F., Akase, T., Kolattukudy, P., & Goshima, Y. (2016). CRMP1 and CRMP2 have synergistic but distinct roles in dendritic development. *Genes to Cells*, 21(9), 994–1005. <https://doi.org/10.1111/gtc.12399>
- Marsick, B. M., Roche, F. K., & Letourneau, P. C. (2012). Repulsive axon guidance cues ephrin-A2 and slit3 stop protrusion of the growth cone leading margin concurrently with inhibition of ADF/cofilin and ERM proteins. *Cytoskeleton*, 69(7), 496–505.
<https://doi.org/10.1002/cm.21016>
- Martins-De-Souza, D., Dias-Neto, E., Schmitt, A., Falkai, P., Gormanns, P., MacCarrone, G., Turck, C. W., & Gattaz, W. F. (2010). Proteome analysis of schizophrenia brain tissue.

- In *World Journal of Biological Psychiatry* (Vol. 11, Issue 2, pp. 110–120).
<https://doi.org/10.3109/15622970903490626>
- Mathiasen, M. L., Dillingham, C. M., Kinnavane, L., Powell, A. L., & Aggleton, J. P. (2017). *ASYMMETRIC CROSS-HEMISPHERIC CONNECTIONS LINK THE RAT ANTERIOR THALAMIC NUCLEI WITH THE CORTEX AND HIPPOCAMPAL FORMATION*.
<https://doi.org/10.1016/j.neuroscience.2017.02.026>
- Matsumoto, N., Kitanishi, T., & Mizuseki, K. (2019). The subiculum: Unique hippocampal hub and more. *Neuroscience Research*, *143*, 1–12.
<https://doi.org/10.1016/j.neures.2018.08.002>
- Meberg, P. J., Ono, S., Minamide, L. S., Takahashi, M., & Bamburg, J. R. (1998). Actin depolymerizing factor and cofilin phosphorylation dynamics: Response to signals that regulate neurite extension. *Cell Motility and the Cytoskeleton*, *39*(2), 172–190.
[https://doi.org/10.1002/\(SICI\)1097-0169\(1998\)39:2<172::AID-CM8>3.0.CO;2-8](https://doi.org/10.1002/(SICI)1097-0169(1998)39:2<172::AID-CM8>3.0.CO;2-8)
- Miller, B. H., Zeier, Z., Xi, L., Lanz, T. A., Deng, S., Strathmann, J., Willoughby, D., Kenny, P. J., Elsworth, J. D., Lawrence, M. S., Roth, R. H., Edbauer, D., Kleiman, R. J., & Wahlestedt, C. (2012). MicroRNA-132 dysregulation in schizophrenia has implications for both neurodevelopment and adult brain function. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, *109*(8), 3125–3130.
<https://doi.org/10.1073/pnas.1113793109>
- Mimura, F., Yamagishi, S., Arimura, N., Fujitani, M., Kubo, T., Kaibuchi, K., & Yamashita, T. (2006). Myelin-associated glycoprotein inhibits microtubule assembly by a Rho-kinase-dependent mechanism. *Journal of Biological Chemistry*, *281*(23), 15970–15979.
<https://doi.org/10.1074/jbc.M510934200>
- Minturn, J. E., Fryer, H. J. L., Geschwind, D. H., & Hockfield, S. (1995). TOAD-64, a Gene Expressed Early in Neuronal Differentiation in the Rat, Is Related to uric-33, a *Cm elegans* Gene Involved in Axon Outgrowth. In *The Journal of Neuroscience*.
- Mitsui, N., Inatome, R., Takahashi, S., Goshima, Y., Yamamura, H., & Yanagi, S. (2002). *Involvement of Fes Fps tyrosine kinase in semaphorin3A signaling*.
- Mokhtar, S. H., Kim, M. J., Magee, K. A., Aui, P. M., Thomas, S., Bakhuraysah, M. M., Alrehaili, A. A., Lee, J. Y., Steer, D. L., Kenny, R., McLean, C., Azari, M. F.,

- Birpanagos, A., Lipiec, E., Heraud, P., Wood, B., & Petratos, S. (2018). Amyloid-beta-dependent phosphorylation of collapsin response mediator protein-2 dissociates kinesin in Alzheimer's disease. *Neural Regeneration Research*, *13*(6), 1066–1080.
<https://doi.org/10.4103/1673-5374.233451>
- Moretti, S., Procopio, A., Lazzarini, R., Rippo, M. R., Testa, R., Marra, M., Tamagnone, L., & Catalano, A. (2008). Semaphorin3A signaling controls Fas (CD95)-mediated apoptosis by promoting Fas translocation into lipid rafts. *Blood*, *111*(4), 2290–2299.
<https://doi.org/10.1182/blood-2007-06-096529>
- Morgan-Fisher, M., Couchman, J. R., & Yoneda, A. (2013). Phosphorylation and mRNA splicing of collapsin response mediator protein-2 determine inhibition of rho-associated protein kinase (ROCK) II function in carcinoma cell migration and invasion. *Journal of Biological Chemistry*, *288*(43), 31229–31240. <https://doi.org/10.1074/jbc.M113.505602>
- Morinaka, A., Yamada, M., Itofusa, R., Funato, Y., Yoshimura, Y., Nakamura, F., Yoshimura, T., Kaibuchi, K., Goshima, Y., Hoshino, M., Kamiguchi, H., & Miki, H. (2011). Thioredoxin Mediates Oxidation-Dependent Phosphorylation of CRMP2 and Growth Cone Collapse. *Science Signaling*, *4*(170), ra26–ra26.
<https://doi.org/10.1126/scisignal.2001127>
- Moutal, A., Dustrude, E. T., Largent-Milnes, T. M., Vanderah, T. W., Khanna, M., & Khanna, R. (2018). Blocking CRMP2 SUMOylation reverses neuropathic pain HHS Public Access. *Mol Psychiatry*, *23*(11), 2119–2121. <https://doi.org/10.1038/mp.2017.117>
- Moutal, Aubin, & Khanna, R. (2018). Unconventional Signaling by Extracellular CRMP2: Possible Role as an Atypical Neurotransmitter? *Neuroscience*, *376*, 224–226.
<https://doi.org/10.1016/j.neuroscience.2018.02.025>
- Moutal, Aubin, Luo, S., Largent-Milnes, T. M., Vanderah, T. W., & Khanna, R. (2019). *Cdk5-mediated CRMP2 phosphorylation is necessary and sufficient for peripheral neuropathic pain*. <https://doi.org/10.1016/j.ynpai.2018.07.003>
- Muha, V., Williamson, R., Hills, R., McNeilly, A. D., McWilliams, T. G., Alonso, J., Schimpl, M., Leney, A. C., Heck, A. J. R., Sutherland, C., Read, K. D., McCrimmon, R. J., Brooks, S. P., & Van Aalten, D. M. F. (2019). Loss of CRMP2 O-GlcNAcylation leads to reduced novel object recognition performance in mice. *Open Biology*, *9*(11).

<https://doi.org/10.1098/rsob.190192>

- Munro, S. (2003). Review Lipid Rafts: Elusive or Illusive? detection, resistance to solubilization by the nonionic. In *Cell* (Vol. 115).
- Myers, J. P., Santiago-Medina, M., & Gomez, T. M. (2011). Regulation of axonal outgrowth and pathfinding by integrin-ecm interactions. *Developmental Neurobiology*, *71*(11), 901–923. <https://doi.org/10.1002/dneu.20931>
- Myers, K. A., Tint, I., Nadar, C. V., He, Y., Black, M. M., & Baas, P. W. (2006). Antagonistic forces generated by cytoplasmic dynein and myosin-II during growth cone turning and axonal retraction. *Traffic*, *7*(10), 1333–1351. <https://doi.org/10.1111/j.1600-0854.2006.00476.x>
- Myllykoski, M., Baumann, A., Hensley, K., & Kursula, P. (2017). Collapsin response mediator protein 2: high-resolution crystal structure sheds light on small-molecule binding, post-translational modifications, and conformational flexibility. *Amino Acids*, *49*(4), 747–759. <https://doi.org/10.1007/s00726-016-2376-z>
- Nacher, J., Rosell, D. R., & Mcewen, B. S. (2000). Widespread Expression of Rat Collapsin Response-Mediated Protein 4 in the Telencephalon and Other Areas of the Adult Rat Central Nervous System. In *J. Comp. Neurol* (Vol. 424).
- Nagai, J., Goshima, Y., & Ohshima, T. (2012). CRMP4 mediates MAG-induced inhibition of axonal outgrowth and protection against Vincristine-induced axonal degeneration. *Neuroscience Letters*, *519*(1), 56–61. <https://doi.org/10.1016/j.neulet.2012.05.020>
- Nagai, J., Kitamura, Y., Owada, K., Yamashita, N., Takei, K., Goshima, Y., & Ohshima, T. (2015). Crmp4 deletion promotes recovery from spinal cord injury by neuroprotection and limited scar formation. *Scientific Reports*, *5*, 1–12. <https://doi.org/10.1038/srep08269>
- Nagai, J., Owada, K., Kitamura, Y., Goshima, Y., & Ohshima, T. (2016). Inhibition of CRMP2 phosphorylation repairs CNS by regulating neurotrophic and inhibitory responses. *Experimental Neurology*, *277*, 283–295. <https://doi.org/10.1016/j.expneurol.2016.01.015>
- Nakai, Y., & Kamiguchi, H. (2002). Migration of nerve growth cones requires detergent-resistant membranes in a spatially defined and substrate-dependent manner. *Journal of*

Cell Biology, 159(6), 1097–1108. <https://doi.org/10.1083/jcb.200209077>

Nakamura, F., Ohshima, T., & Goshima, Y. (2020). Collapsin Response Mediator Proteins: Their Biological Functions and Pathophysiology in Neuronal Development and Regeneration. In *Frontiers in Cellular Neuroscience* (Vol. 14). Frontiers Media S.A. <https://doi.org/10.3389/fncel.2020.00188>

Neubig, R. R. (1994). Membrane organization in G-protein mechanisms. *The FASEB Journal*, 8(12), 939–946. <https://doi.org/10.1096/fasebj.8.12.8088459>

Niethammer, P., Delling, M., Sytnyk, V., Dityatev, A., Fukami, K., & Schachner, M. (2002). Cosignaling of NCAM via lipid rafts and the FGF receptor is required for neuritogenesis. *Journal of Cell Biology*, 157(3), 521–532. <https://doi.org/10.1083/jcb.200109059>

Niisato, E., Nagai, J., Yamashita, N., Abe, T., Kiyonari, H., Goshima, Y., & Ohshima, T. (2012). CRMP4 suppresses apical dendrite bifurcation of CA1 pyramidal neurons in the mouse hippocampus. *Developmental Neurobiology*, 72(11), 1447–1457. <https://doi.org/10.1002/dneu.22007>

Niisato, E., Nagai, J., Yamashita, N., Nakamura, F., Goshima, Y., & Ohshima, T. (2013). Phosphorylation of CRMP2 is involved in proper bifurcation of the apical dendrite of hippocampal CA1 pyramidal neurons. *Developmental Neurobiology*, 73(2), 142–151. <https://doi.org/10.1002/dneu.22048>

Niwa, S., Nakamura, F., Tomabechi, Y., Aoki, M., Shigematsu, H., Matsumoto, T., Yamagata, A., Fukai, S., Hirokawa, N., Goshima, Y., Shirouzu, M., & Nitta, R. (2017). Structural basis for CRMP2-induced axonal microtubule formation. *Scientific Reports*, 7(1). <https://doi.org/10.1038/s41598-017-11031-4>

Nozumi, M., Nakatsu, F., Katoh, K., & Igarashi, M. (2017). Coordinated Movement of Vesicles and Actin Bundles during Nerve Growth Revealed by Superresolution Microscopy. *Cell Reports*, 18(9), 2203–2216. <https://doi.org/10.1016/j.celrep.2017.02.008>

Nozumi, M., Togano, T., Takahashi-Niki, K., Lu, J., Honda, A., Taoka, M., Shinkawa, T., Koga, H., Takeuchi, K., Isobe, T., & Igarashi, M. (2009). Identification of functional marker proteins in the mammalian growth cone. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 106(40), 17211–17216.

<https://doi.org/10.1073/pnas.0904092106>

- O'Mara, S. M., Commins, S., Anderson, M., & Gigg, J. (2001). The subiculum: A review of form, physiology and function. *Progress in Neurobiology*, *64*(2), 129–155.
[https://doi.org/10.1016/S0301-0082\(00\)00054-X](https://doi.org/10.1016/S0301-0082(00)00054-X)
- Oh, W. J., & Gu, C. (2013). The role and mechanism-of-action of Sema3E and Plexin-D1 in vascular and neural development. In *Seminars in Cell and Developmental Biology* (Vol. 24, Issue 3, pp. 156–162). Elsevier Ltd. <https://doi.org/10.1016/j.semdb.2012.12.001>
- Ohtani-Kaneko, R. (2019). Crmp4-KO mice as an animal model for investigating certain phenotypes of autism spectrum disorders. In *International Journal of Molecular Sciences* (Vol. 20, Issue 10). MDPI AG. <https://doi.org/10.3390/ijms20102485>
- Oliemuller, E., Peláez, R., Garasa, S., Pajares, M. J., Agorreta, J., Pío, R., Montuenga, L. M., Teijeira, A., Llanos, S., & Rouzaut, A. (2013). Phosphorylated tubulin adaptor protein CRMP-2 as prognostic marker and candidate therapeutic target for NSCLC. *International Journal of Cancer*, *132*(9), 1986–1995. <https://doi.org/10.1002/ijc.27881>
- Omotade, O. F., Pollitt, S. L., & Zheng, J. Q. (2017). Actin-based growth cone motility and guidance. *Molecular and Cellular Neuroscience*, *84*, 4–10.
<https://doi.org/10.1016/j.mcn.2017.03.001>
- Park, S. Y., Kim, J. T., Park, E. S., Hwang, Y. S., Yoon, H. R., Baek, K. E., Jung, H., Yoon, S. R., Kim, B. Y., Cho, H. J., & Lee, H. G. (2021). Collapsin response mediator protein 4 enhances the radiosensitivity of colon cancer cells through calcium-mediated cell signaling. *Oncology Reports*, *45*(4), 1–12. <https://doi.org/10.3892/or.2021.7957>
- Pecho-Vrieseling, E., Sigrist, M., Yoshida, Y., Jessell, T. M., & Arber, S. (2009). Specificity of sensory-motor connections encoded by Sema3e-Plxnd1 recognition. *Nature*, *459*(7248), 842–846. <https://doi.org/10.1038/nature08000>
- Pediconi, M. F., Gallegos, C. E., De Los Santos, E. B., & Barrantes, F. J. (2004). Metabolic cholesterol depletion hinders cell-surface trafficking of the nicotinic acetylcholine receptor. *Neuroscience*, *128*(2), 239–249.
<https://doi.org/10.1016/j.neuroscience.2004.06.007>
- Pennington, K., Dicker, P., Dunn, M. J., & Cotter, D. R. (2008). Proteomic analysis reveals

- protein changes within layer 2 of the insular cortex in schizophrenia. *Proteomics*, 8(23–24), 5097–5107. <https://doi.org/10.1002/pmic.200800415>
- Petratos, S., Li, Q. X., George, A. J., Hou, X., Kerr, M. L., Unabia, S. E., Hatzinisiriou, I., Maksel, D., Aguilar, M. I., & Small, D. H. (2008). The β -amyloid protein of Alzheimer's disease increases neuronal CRMP-2 phosphorylation by a Rho-GTP mechanism. *Brain*, 131(1), 90–108. <https://doi.org/10.1093/brain/awm260>
- Pham, X., Song, G., Lao, S., Goff, L., Zhu, H., Valle, D., & Avramopoulos, D. (2016). The DPYSL2 gene connects mTOR and schizophrenia. *Translational Psychiatry*, 6(11). <https://doi.org/10.1038/tp.2016.204>
- Pike, L. J. (2004). Lipid rafts: heterogeneity on the high seas. In *Biochem. J* (Vol. 378).
- Pike, L. J. (2006). Rafts defined: A report on the Keystone symposium on lipid rafts and cell function. *Journal of Lipid Research*, 47(7), 1597–1598. <https://doi.org/10.1194/jlr.E600002-JLR200>
- Piper, M., Anderson, R., Dwivedy, A., Weinl, C., Van Horck, F., Leung, K. M., Cogill, E., & Holt, C. (2006). Signaling mechanisms underlying Slit2-induced collapse of *Xenopus* retinal growth cones. *Neuron*, 49(2), 215–228. <https://doi.org/10.1016/j.neuron.2005.12.008>
- Pollard, T. D., Blanchoin, L., & Mullins, R. D. (2000). *MOLECULAR MECHANISMS CONTROLLING ACTIN FILAMENT DYNAMICS IN NONMUSCLE CELLS*.
- Ponnusamy, R., & Lohkamp, B. (2013). Insights into the oligomerization of CRMPs: Crystal structure of human collapsin response mediator protein 5. *Journal of Neurochemistry*, 125(6), 855–868. <https://doi.org/10.1111/jnc.12188>
- Purohit, A. A., Li, W., Qu, C., Dwyer, T., Shao, Q., Guan, K.-L., & Liu, G. (2012). Down Syndrome Cell Adhesion Molecule (DSCAM) Associates with Uncoordinated-5C (UNC5C) in Netrin-1-mediated Growth Cone Collapse *. <https://doi.org/10.1074/jbc.M112.340174>
- Quinn, C. C., Chen, E., Kinjo, T. G., Kelly, G., Bell, A. W., Elliott, R. C., Mcpherson, P. S., & Hockfield, S. (2003). *TUC-4b, a Novel TUC Family Variant, Regulates Neurite Outgrowth and Associates with Vesicles in the Growth Cone*.

- Rajasekharan, S., & Kennedy, T. E. (2009). The netrin protein family. *Genome Biology*, *10*(9), 239. <https://doi.org/10.1186/gb-2009-10-9-239>
- RajMohan, V., & Mohandas, E. (2007). The limbic system. *Indian Journal of Psychiatry*, *49*(2), 132. <https://doi.org/10.4103/0019-5545.33264>
- Ramos, A., Rodríguez-Seoane, C., Rosa, I., Gorroño-Etxebarria, I., Alonso, J., Veiga, S., Korth, C., Kypta, R. M., García, Á., & Requena, J. R. (2019). Proteomic studies reveal disrupted in schizophrenia 1 as a player in both neurodevelopment and synaptic function. *International Journal of Molecular Sciences*, *20*(1), 1–13. <https://doi.org/10.3390/ijms20010119>
- Rembutsu, M., Soutar, M. P. M., Van Aalten, L., Gourlay, R., Hastie, C. J., McLauchlan, H., Morrice, N. A., Cole, A. R., & Sutherland, C. (2008). Novel procedure to investigate the effect of phosphorylation on protein complex formation in vitro and in cells. *Biochemistry*, *47*(7), 2153–2161. <https://doi.org/10.1021/bi702030w>
- Ricard, D., Stankoff, B., Bagnard, D., Aguera, M., Rogemond, V., Antoine, J. C., Spassky, N., Zalc, B., Lubetzki, C., Belin, M. F., & Honnorat, J. (2000). Differential expression of collapsin response mediator proteins (CRMP/Ulip) in subsets of oligodendrocytes in the postnatal rodent brain. *Molecular and Cellular Neurosciences*, *16*(4), 324–337. <https://doi.org/10.1006/mcne.2000.0888>
- Ricard, D., Stankoff, B., Bagnard, D., Aguera, M., Rogemond, V., Antoine, J. C., Spassky, N., Zalc, B., Lubetzki, C., Belin, M. F., & Honnorat, J. (2000). *Differential Expression of Collapsin Response Mediator Proteins (CRMP/ULIP) in Subsets of Oligodendrocytes in the Postnatal Rodent Brain*. <https://doi.org/10.1006/mcne.2000.0888>
- Ricard, Damien, Ronique Rogemond, V., Charrier, E., Le Aguera, M., Bagnard, D., Oise Belin, M.-F., Thomasset, N., & Rô Me Honnorat, J. (2001). *Isolation and Expression Pattern of Human Unc-33-Like Phosphoprotein 6/Collapsin Response Mediator Protein 5 (Ulip6/CRMP5): Coexistence with Ulip2/CRMP2 in Sema3A-Sensitive Oligodendrocytes*.
- Ringman, J. M., O'Neill, J., Geschwind, D., Medina, L., Apostolova, L. G., Rodriguez, Y., Schaffer, B., Varpetian, A., Tseng, B., Ortiz, F., Fitten, J., Cummings, J. L., & Bartzokis, G. (2007). Diffusion tensor imaging in preclinical and presymptomatic carriers of

- familial Alzheimer's disease mutations. *Brain*, *130*(7), 1767–1776.
<https://doi.org/10.1093/brain/awm102>
- Rogemond, V., Auger, C., Giraudon, P., Becchi, M., Auvergnon, N., Belin, M. F., Honnorat, J., & Moradi-Améli, M. (2008). Processing and nuclear localization of CRMP2 during brain development induce neurite outgrowth inhibition. *Journal of Biological Chemistry*, *283*(21), 14751–14761. <https://doi.org/10.1074/jbc.M708480200>
- Roselló-Busquets, C., de la Oliva, N., Martínez-Mármol, R., Hernaiz-Llorens, M., Pascual, M., Muhaisen, A., Navarro, X., del Valle, J., & Soriano, E. (2019). Cholesterol depletion regulates axonal growth and enhances central and peripheral nerve regeneration. *Frontiers in Cellular Neuroscience*, *13*. <https://doi.org/10.3389/fncel.2019.00040>
- Rosenberg, P. B., Nowrangi, M. A., & Lyketsos, C. G. (2015). Neuropsychiatric symptoms in Alzheimer's disease: What might be associated brain circuits? In *Molecular Aspects of Medicine* (Vols. 43–44, pp. 25–37). Elsevier Ltd.
<https://doi.org/10.1016/j.mam.2015.05.005>
- Rosslenbroich, V., Dai, L., Baader, S. L., Noegel, A. A., Gieselmann, V., & Kappler, J. (2005). Collapsin response mediator protein-4 regulates F-actin bundling. *Experimental Cell Research*, *310*(2), 434–444. <https://doi.org/10.1016/j.yexcr.2005.08.005>
- Rosslenbroich, V., Dai, L., Franken, S., Gehrke, M., Junghans, U., Gieselmann, V., & Kappler, J. (2003). Subcellular localization of collapsin response mediator proteins to lipid rafts. *Biochemical and Biophysical Research Communications*, *305*(2), 392–399.
[https://doi.org/10.1016/S0006-291X\(03\)00754-X](https://doi.org/10.1016/S0006-291X(03)00754-X)
- Rouzaut, A., López-Moratalla, N., & De Miguel, C. (2000). Differential gene expression in the activation and maturation of human monocytes. *Archives of Biochemistry and Biophysics*, *374*(2), 153–160. <https://doi.org/10.1006/abbi.1999.1587>
- Rozelle, A. L., Machesky, L. M., Yamamoto, M., Driessens, M. H. E., Insall, R. H., Roth, M. G., Luby-Phelps, K., Marriott, G., Hall, A., & Yin, H. L. (2000). *Phosphatidylinositol 4,5-bisphosphate induces actin-based movement of raft-enriched vesicles through WASP-Arp2/3*.
- Rozés Salvador, V., Heredia, F., Berardo, A., Palandri, A., Wojnacki, J., Vivinetto, A. L., Sheikh, K. A., Caceres, A., & Lopez, P. H. H. (2016). Anti-glycan antibodies halt axon

- regeneration in a model of Guillain Barré Syndrome axonal neuropathy by inducing microtubule disorganization via RhoA-ROCK-dependent inactivation of CRMP-2. *Experimental Neurology*, 278, 42–53. <https://doi.org/10.1016/j.expneurol.2016.01.016>
- Rünker, A. E., O’Tuathaigh, C., Dunleavy, M., Morris, D. W., Little, G. E., Corvin, A. P., Gill, M., Henshall, D. C., Waddington, J. L., & Mitchell, K. J. (2011). Mutation of Semaphorin-6A disrupts limbic and cortical connectivity and models neurodevelopmental psychopathology. *PLoS ONE*, 6(11). <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0026488>
- Sahin, M., Greer, P. L., Lin, M. Z., Poucher, H., Eberhart, J., Schmidt, S., Wright, T. M., Shamah, S. M., O’Connell, S., Cowan, C. W., Hu, L., Goldberg, J. L., Debant, A., Corfas, G., Krull, C. E., & Greenberg, M. E. (2005). Eph-dependent tyrosine phosphorylation of ephexin1 modulates growth cone collapse. *Neuron*, 46(2), 191–204. <https://doi.org/10.1016/j.neuron.2005.01.030>
- Samson, R. D., & Barnes, C. A. (2013). Impact of aging brain circuits on cognition. *European Journal of Neuroscience*, 37(12), 1903–1915. <https://doi.org/10.1111/ejn.12183>
- Samsonov, A. V., Mihalyov, I., & Cohen, F. S. (2001). Characterization of cholesterol-sphingomyelin domains and their dynamics in bilayer membranes. *Biophysical Journal*, 81(3), 1486–1500. [https://doi.org/10.1016/S0006-3495\(01\)75803-1](https://doi.org/10.1016/S0006-3495(01)75803-1)
- Sánchez, S. M., Duarte-Abritta, B., Abulafia, C., De Pino, G., Bocaccio, H., Castro, M. N., Sevelever, G. E., Fonzo, G. A., Nemeroff, C. B., Gustafson, D. R., Guinjoan, S. M., & Villarreal, M. F. (2020). White matter fiber density abnormalities in cognitively normal adults at risk for late-onset Alzheimer’s disease. *Journal of Psychiatric Research*, 122(December 2019), 79–87. <https://doi.org/10.1016/j.jpsychires.2019.12.019>
- Sasaki, Y., Cheng, C., Uchida, Y., Nakajima, O., Ohshima, T., Yagi, T., Taniguchi, M., Nakayama, T., Kishida, R., Kudo, Y., Ohno, S., Nakamura, F., & Goshima, Y. (2002). Fyn and Cdk5 mediate semaphorin-3A signaling, which is involved in regulation of dendrite orientation in cerebral cortex. *Neuron*, 35(5), 907–920. [https://doi.org/10.1016/s0896-6273\(02\)00857-7](https://doi.org/10.1016/s0896-6273(02)00857-7)
- Schaefer, A. W., Schoonderwoert, V. T. G., Ji, L., Mederios, N., Danuser, G., & Forscher, P. (2008). Coordination of Actin Filament and Microtubule Dynamics during Neurite

Outgrowth. *Developmental Cell*, 15(1), 146–162.

<https://doi.org/10.1016/j.devcel.2008.05.003>

Schaefer, J., Giangrande, E., Weinberger, D. R., & Dickinson, D. (2013). The global cognitive impairment in schizophrenia: Consistent over decades and around the world. In *Schizophrenia Research* (Vol. 150, Issue 1, pp. 42–50). NIH Public Access.
<https://doi.org/10.1016/j.schres.2013.07.009>

Schlegel, J., Peters, S., Doose, S., Schubert-Unkmeir, A., & Sauer, M. (2019). Super-Resolution Microscopy Reveals Local Accumulation of Plasma Membrane Gangliosides at *Neisseria meningitidis* Invasion Sites. *Frontiers in Cell and Developmental Biology*, 7(September), 1–12. <https://doi.org/10.3389/fcell.2019.00194>

Scifo, E., Szwajda, A., Soliymani, R., Pezzini, F., Bianchi, M., Dapkunas, A., Debski, J., Uusi-Rauva, K., Dadlez, M., Gingras, A. C., Tyynelä, J., Simonati, A., Jalanko, A., Baumann, M. H., & Lalowski, M. (2015). Proteomic analysis of the palmitoyl protein thioesterase 1 interactome in SH-SY5Y human neuroblastoma cells. *Journal of Proteomics*, 123(Haartmaninkatu 8), 42–53. <https://doi.org/10.1016/j.jprot.2015.03.038>

Sekine, Y., Algarate, P. T., Cafferty, W. B. J., & Strittmatter, S. M. (2019). Plexina2 and CRMP2 signaling complex is activated by nogo-a-liganded ngr1 to restrict corticospinal axon sprouting after trauma. *Journal of Neuroscience*, 39(17), 3204–3216.
<https://doi.org/10.1523/JNEUROSCI.2996-18.2019>

Self, T. J., Oakley, S. M., & Hill, S. J. (2005). Clathrin-independent internalization of the human histamine H₁-receptor in CHO-K1 cells. *British Journal of Pharmacology*, 146(4), 612–624. <https://doi.org/10.1038/sj.bjp.0706337>

Senova, S., Fomenko, A., Gondard, E., & Lozano, A. M. (2020). Anatomy and function of the fornix in the context of its potential as a therapeutic target. In *Journal of Neurology, Neurosurgery and Psychiatry* (Vol. 91, Issue 5, pp. 547–559). BMJ Publishing Group.
<https://doi.org/10.1136/jnnp-2019-322375>

Sezgin, E., Levental, I., Mayor, S., & Eggeling, C. (2017). The mystery of membrane organization: Composition, regulation and roles of lipid rafts. In *Nature Reviews Molecular Cell Biology* (Vol. 18, Issue 6, pp. 361–374). Nature Publishing Group.
<https://doi.org/10.1038/nrm.2017.16>

- Shapovalova, Z., Tabunshchik, K., & Greer, P. A. (2007). The Fer tyrosine kinase regulates an axon retraction response to Semaphorin 3A in dorsal root ganglion neurons. *BMC Developmental Biology*, 7. <https://doi.org/10.1186/1471-213X-7-133>
- Shen, K., & Cowan, C. W. (2010). Guidance Molecules in Synapse Formation and Plasticity. *Perspectives in Biology*, 1–18.
- Shimada, K., Ishikawa, T., Nakamura, F., Shimizu, D., Chishima, T., Ichikawa, Y., Sasaki, T., Endo, I., Nagashima, Y., & Goshima, Y. (2014). Collapsin response mediator protein 2 is involved in regulating breast cancer progression. *Breast Cancer*, 21(6), 715–723. <https://doi.org/10.1007/s12282-013-0447-5>
- Shu, T., Valentino, K. M., Seaman, C., Cooper, H. M., & Richards, L. J. (1999). Expression of the netrin-1 receptor, deleted in colorectal cancer (DCC), is largely confined to projecting neurons in the developing forebrain. *Journal of Comparative Neurology*, 416(2), 201–212. [https://doi.org/10.1002/\(SICI\)1096-9861\(20000110\)416:2<201::AID-CNE6>3.0.CO;2-Z](https://doi.org/10.1002/(SICI)1096-9861(20000110)416:2<201::AID-CNE6>3.0.CO;2-Z)
- Silver, L., Michael, J. V., Goldfinger, L. E., & Gallo, G. (2014). Activation of PI3K and R-ras signaling promotes the extension of sensory axons on inhibitory chondroitin sulfate proteoglycans. *Developmental Neurobiology*, 74(9), 918–933. <https://doi.org/10.1002/dneu.22174>
- Simons, K., & Ikonen, E. (1997). Functional rafts in cell membranes. In *Nature* © Macmillan Publishers Ltd (Vol. 387).
- Simons, K., & Sampaio, J. L. (2011). Membrane organization and lipid rafts. In *Cold Spring Harbor Perspectives in Biology* (Vol. 3, Issue 10, pp. 1–17). Cold Spring Harbor Laboratory Press. <https://doi.org/10.1101/cshperspect.a004697>
- Singer, S. J., & Nicolson, G. L. (1972). The fluid mosaic model of the structure of cell membranes. *Science*, 175(4023), 720–731. <https://doi.org/10.1126/science.175.4023.720>
- Solis, G. P., Hoegg, M., Munderloh, C., Schrock, Y., Malaga-Trillo, E., Rivera-Milla, E., & Stuermer, C. A. O. (2007). Reggie/flotillin proteins are organized into stable tetramers in membrane microdomains. *Biochemical Journal*, 403(2), 313–322. <https://doi.org/10.1042/BJ20061686>

- Sonnino, S., Mauri, L., Chigorno, V., & Prinetti, A. (2007). Gangliosides as components of lipid membrane domains. In *Glycobiology* (Vol. 17, Issue 1). Oxford University Press. <https://doi.org/10.1093/glycob/cwl052>
- Sot, J., Collado, M. I., Arrondo, J. L. R., Alonso, A., & Goñ, F. M. (2002). Triton X-100-resistant bilayers: Effect of lipid composition and relevance to the raft phenomenon. *Langmuir*, *18*(7), 2828–2835. <https://doi.org/10.1021/la011381c>
- Stenmark, P., Ogg, D., Flodin, S., Flores, A., Kotenyova, T., Nyman, T., Nordlund, P., & Kursula, P. (2007). The structure of human collapsin response mediator protein 2, a regulator of axonal growth. *Journal of Neurochemistry*, *101*(4), 906–917. <https://doi.org/10.1111/j.1471-4159.2006.04401.x>
- Stoeckli, E. T. (2018). Understanding axon guidance: Are we nearly there yet? *Development (Cambridge)*, *145*(10). <https://doi.org/10.1242/dev.151415>
- Su, K. Y., Chien, W. L., Fu, W. M., Yu, I. S., Huang, H. P., Huang, P. H., Lin, S. R., Shih, J. Y., Lin, Y. L., Hsueh, Y. P., Yang, P. C., & Lin, S. W. (2007). Mice deficient in collapsin response mediator protein-1 exhibit impaired long-term potentiation and impaired spatial learning and memory. *Journal of Neuroscience*, *27*(10), 2513–2524. <https://doi.org/10.1523/JNEUROSCI.4497-06.2007>
- Surma, M. A., Klose, C., & Simons, K. (2012). Lipid-dependent protein sorting at the trans-Golgi network. In *Biochimica et Biophysica Acta - Molecular and Cell Biology of Lipids* (Vol. 1821, Issue 8, pp. 1059–1067). <https://doi.org/10.1016/j.bbalip.2011.12.008>
- Suter, D. M., Errante, L. D., Belotserkovsky, V., & Forscher, P. (1998). The Ig superfamily cell adhesion molecule, apCAM, mediates growth cone steering by substrate-cytoskeletal coupling. *Journal of Cell Biology*, *141*(1), 227–240. <https://doi.org/10.1083/jcb.141.1.227>
- Suzuki, Y., Nakagomi, S., Namikawa, K., Kiryu-Seo, S., Inagaki, N., Kaibuchi, K., Aizawa, H., Kikuchi, K., & Kiyama, H. (2003). Collapsin response mediator protein-2 accelerates axon regeneration of nerve-injured motor neurons of rat. *Journal of Neurochemistry*, *86*(4), 1042–1050. <https://doi.org/10.1046/j.1471-4159.2003.01920.x>
- Takaya, R., Nagai, J., Piao, W., Niisato, E., Nakabayashi, T., Yamazaki, Y., Nakamura, F., Yamashita, N., Kolattukudy, P., Goshima, Y., & Ohshima, T. (2017). CRMP1 and

- CRMP4 are required for proper orientation of dendrites of cerebral pyramidal neurons in the developing mouse brain. *Brain Research*, 1655, 161–167.
<https://doi.org/10.1016/j.brainres.2016.11.003>
- Takemura, R., Okabe, S., Umeyama, T., Kanai, Y., Cowan, N. J., & Hirokawa, N. (1992). Increased microtubule stability and alpha tubulin acetylation in cells transfected with microtubule-associated proteins MAP1B, MAP2 or tau. *Journal of Cell Science*, 103(4), 953–964. <https://doi.org/10.1242/jcs.103.4.953>
- Tamagnone, L., Artigiani, S., Chen, H., He, Z., Ming, G., Song, H., Chedotal, A., Winberg, M. L., Goodman, C. S., Mu-ming Poo, 4, Marc Tessier-Lavigne, 2, & Comoglio1, and P. M. (1999). *Plexins Are a Large Family of Receptors for Transmembrane, Secreted, and GPI-Anchored Semaphorins in Vertebrates*.
- Tan, F., Thiele, C. J., & Li, Z. (2014). Collapsin response mediator proteins: Potential diagnostic and prognostic biomarkers in cancers (review). In *Oncology Letters* (Vol. 7, Issue 5, pp. 1333–1340). Spandidos Publications. <https://doi.org/10.3892/ol.2014.1909>
- Tan, M., Cha, C., Ye, Y., Zhang, J., Li, S., Wu, F., Gong, S., & Guo, G. (2015). CRMP4 and CRMP2 interact to coordinate cytoskeleton dynamics, regulating growth cone development and axon elongation. *Neural Plasticity*, 2015.
<https://doi.org/10.1155/2015/947423>
- Tan, M., Ma, S., Huang, Q., Hu, K., Song, B., & Li, M. (2013). GSK-3 α/β -mediated phosphorylation of CRMP-2 regulates activity-dependent dendritic growth. *Journal of Neurochemistry*, 125(5), 685–697. <https://doi.org/10.1111/jnc.12230>
- Tanaka, E. M., & Kirschner, M. W. (1991). Microtubule behavior in the growth cones of living neurons during axon elongation. *Journal of Cell Biology*, 115(2), 345–363.
<https://doi.org/10.1083/jcb.115.2.345>
- Tassew, N. G., Mothe, A. J., Shabanzadeh, A. P., Banerjee, P., Koeberle, P. D., Bremner, R., Tator, C. H., & Monnier, P. P. (2014). Modifying lipid rafts promotes regeneration and functional recovery. In *Cell Reports* (Vol. 8, Issue 4, pp. 1146–1159).
<https://doi.org/10.1016/j.celrep.2014.06.014>
- Thomas, A. G., Koumellis, P., & Dineen, R. A. (2011). The fornix in health and disease: an imaging review. *Radiographics : A Review Publication of the Radiological Society of*

North America, Inc, 31(4), 1107–1121. <https://doi.org/10.1148/rg.314105729>

- Torres, R., & Polymeropoulos, M. H. (1998). Genomic Organization and Localization of the Human CRMP-1 Gene. In *DNA RESEARCH* (Vol. 5).
<https://academic.oup.com/dnaresearch/article-abstract/5/6/393/361022>
- Tortosa, E., Adolfs, Y., Fukata, M., Pasterkamp, R. J., Kapitein, L. C., & Hoogenraad, C. C. (2017). Dynamic Palmitoylation Targets MAP6 to the Axon to Promote Microtubule Stabilization during Neuronal Polarization. *Neuron*, 94(4), 809-825.e7.
<https://doi.org/10.1016/j.neuron.2017.04.042>
- Toyofuku, T., Yoshida, J., Sugimoto, T., Zhang, H., Kumanogoh, A., Hori, M., & Kikutani, H. (2005). FARP2 triggers signals for Sema3A-mediated axonal repulsion. *Nature Neuroscience*, 8(12), 1712–1719. <https://doi.org/10.1038/nn1596>
- Toyoshima, M., Jiang, X., Ogawa, T., Ohnishi, T., Yoshihara, S., Balan, S., Yoshikawa, T., & Hirokawa, N. (2019). Enhanced carbonyl stress induces irreversible multimerization of CRMP2 in schizophrenia pathogenesis. *Life Science Alliance*, 2(5).
<https://doi.org/10.26508/lsa.201900478>
- Trinidad, J. C., & Cohen, J. B. (2004). Neuregulin inhibits acetylcholine receptor aggregation in myotubes. *Journal of Biological Chemistry*, 279(30), 31622–31628.
<https://doi.org/10.1074/jbc.M400044200>
- Tsui-Pierchala, B. A., Encinas, M., Milbrandt, J., & Johnson, E. M. (2002). Lipid rafts in neuronal signaling and function. *Trends in Neurosciences*, 25(8), 412–417.
[https://doi.org/10.1016/s0166-2236\(02\)02215-4](https://doi.org/10.1016/s0166-2236(02)02215-4)
- Tsutiya, A., Nakano, Y., Hansen-Kiss, E., Kelly, B., Nishihara, M., Goshima, Y., Corsmeier, D., White, P., Herman, G. E., & Ohtani-Kaneko, R. (2017). Human CRMP4 mutation and disrupted Crmp4 expression in mice are associated with ASD characteristics and sexual dimorphism. *Scientific Reports*, 7(1). <https://doi.org/10.1038/s41598-017-16782-8>
- Tsutiya, A., & Ohtani-Kaneko, R. (2012). Postnatal alteration of collapsin response mediator protein 4 mRNA expression in the mouse brain. *Journal of Anatomy*, 221(4), 341–351.
<https://doi.org/10.1111/j.1469-7580.2012.01544.x>
- Tsutiya, A., Watanabe, H., Nakano, Y., Nishihara, M., Goshima, Y., & Ohtani-Kaneko, R.

- (2016). Deletion of collapsin response mediator protein 4 results in abnormal layer thickness and elongation of mitral cell apical dendrites in the neonatal olfactory bulb. *Journal of Anatomy*, 228(5), 792–804. <https://doi.org/10.1111/joa.12434>
- Tymanskyj, S. R., Scales, T. M. E., & Gordon-Weeks, P. R. (2012). MAP1B enhances microtubule assembly rates and axon extension rates in developing neurons. *Molecular and Cellular Neuroscience*, 49(2), 110–119. <https://doi.org/10.1016/j.mcn.2011.10.003>
- Uchida, Y., Ohshima, T., Sasaki, Y., Suzuki, H., Yanai, S., Yamashita, N., Nakamura, F., Takei, K., Ihara, Y., Mikoshiba, K., Kolattukudy, P., Honnorat, J., & Goshima, Y. (2005). Semaphorin3A signalling is mediated via sequential Cdk5 and GSK3 β phosphorylation of CRMP2: Implication of common phosphorylating mechanism underlying axon guidance and Alzheimer's disease. *Genes to Cells*, 10(2), 165–179. <https://doi.org/10.1111/j.1365-2443.2005.00827.x>
- Uchida, Y., Ohshima, T., Yamashita, N., Ogawara, M., Sasaki, Y., Nakamura, F., & Goshima, Y. (2009). Semaphorin3A signaling mediated by fyn-dependent tyrosine phosphorylation of collapsin response mediator protein 2 at tyrosine 32. *Journal of Biological Chemistry*, 284(40), 27393–27401. <https://doi.org/10.1074/jbc.M109.000240>
- Uesugi, K., Oinuma, I., Katoh, H., & Negishi, M. (2009). Different requirement for Rnd GTPases of R-Ras GAP activity of Plexin-C1 and Plexin-D1. *Journal of Biological Chemistry*, 284(11), 6743–6751. <https://doi.org/10.1074/jbc.M805213200>
- Um, J. W., & Ko, J. (2017). Neural Glycosylphosphatidylinositol-Anchored Proteins in Synaptic Specification. *Trends in Cell Biology*, 27(12), 931–945. <https://doi.org/10.1016/j.tcb.2017.06.007>
- Valencia, A., Reeves, P. B., Sapp, E., Li, X., Alexander, J., Kegel, K. B., Chase, K., Aronin, N., & DiFiglia, M. (2010). Mutant huntingtin and glycogen synthase kinase 3- β accumulate in neuronal lipid rafts of a presymptomatic knock-in mouse model of Huntington's disease. *Journal of Neuroscience Research*, 88(1), 179–190. <https://doi.org/10.1002/jnr.22184>
- van Meer, G., & Simons, K. (1988). Lipid polarity and sorting in epithelial cells. *Journal of Cellular Biochemistry*, 36(1), 51–58. <https://doi.org/10.1002/jcb.240360106>
- Van Strien, N. M., Cappaert, N. L. M., & Witter, M. P. (2009). The anatomy of memory: An

- interactive overview of the parahippocampal- hippocampal network. In *Nature Reviews Neuroscience* (Vol. 10, Issue 4, pp. 272–282). Nat Rev Neurosci.
<https://doi.org/10.1038/nrn2614>
- van Zanten, T. S., & Mayor, S. (2015). Current approaches to studying membrane organization. In *F1000Research* (Vol. 4). Faculty of 1000 Ltd.
<https://doi.org/10.12688/f1000research.6868.1>
- Vandecandelaere, A., Pedrotti, B., Utton, M. A., Calvert, R. A., & Bayley, P. M. (1996). Differences in the Regulation of Microtubule Dynamics by Microtubule-Associated Proteins MAP1B and MAP2. *Cell Motility and the Cytoskeleton*, 35(2), 134–146.
[https://doi.org/10.1002/\(SICI\)1097-0169\(1996\)35:2<134::AID-CM6>3.0.CO;2-A](https://doi.org/10.1002/(SICI)1097-0169(1996)35:2<134::AID-CM6>3.0.CO;2-A)
- Varadarajan, S. G., Kong, J. H., Phan, K. D., Kao, T.-J., Panaitof, S. C., Cardin, J., Eltzschig, H., Kania, A., Novitch, B. G., & Butler, S. J. (2017). Netrin1 produced by neural progenitors, not floor plate cells, is required for axon guidance in the spinal cord HHS Public Access. *Neuron*, 94(4), 790–799. <https://doi.org/10.1016/j.neuron.2017.03.007>
- Vita, A., De Peri, L., Deste, G., & Sacchetti, E. (2012). Progressive loss of cortical gray matter in schizophrenia: A meta-analysis and meta-regression of longitudinal MRI studies. *Translational Psychiatry*, 2(11), e190-13. <https://doi.org/10.1038/tp.2012.116>
- Wai Yau, K., Philipp Schätzle, X., Tortosa, E., Stéphane Pagès, X., Holtmaat, A., Kapitein, L. C., & Hoogenraad, C. C. (2016). *Cellular/Molecular Dendrites In Vitro and In Vivo Contain Microtubules of Opposite Polarity and Axon Formation Correlates with Uniform Plus-End-Out Microtubule Orientation*.
<https://doi.org/10.1523/JNEUROSCI.2430-15.2016>
- Wang, L.-H., & Strittmatter, S. M. (1996). *A Family of Rat CRMP Genes Is Differentially Expressed in the Nervous System*.
- Wang, L.-H., & Strittmatter, S. M. (1997). *Brain CRMP Forms Heterotetramers Similar to Liver Dihydropyrimidinase*.
- Wang, Yubin, Liu, Y., Bi, X., & Baudry, M. (2020). Calpain-1 and Calpain-2 in the Brain: New Evidence for a Critical Role of Calpain-2 in Neuronal Death. In *Cells* (Vol. 9, Issue 12). NLM (Medline). <https://doi.org/10.3390/cells9122698>

- Wang, Yunliang, Yin, H., Li, J., Zhang, Y., Han, B., Zeng, Z., Qiao, N., Cui, X., Lou, J., & Li, J. (2013). Amelioration of β -amyloid-induced cognitive dysfunction and hippocampal axon degeneration by curcumin is associated with suppression of CRMP-2 hyperphosphorylation. *Neuroscience Letters*, 557(PB), 112–117. <https://doi.org/10.1016/j.neulet.2013.10.024>
- Whishaw, I. Q., & Tomie, J. A. (1997). Piloting and dead reckoning dissociated by fimbria-fornix lesions in a rat food carrying task. *Behavioural Brain Research*, 89(1–2), 87–97. [https://doi.org/10.1016/S0166-4328\(97\)00068-5](https://doi.org/10.1016/S0166-4328(97)00068-5)
- White, B., Lyketsos, C. G., Rosenberg, P. B., Oh, E. S., & Chen, L. (2021). Multiple Neurodegenerative Pathologies in an Alzheimer's Disease Patient Treated with Fornical Deep Brain Stimulation. *Journal of Alzheimer's Disease : JAD*, 80(4), 1383–1387. <https://doi.org/10.3233/JAD-201415>
- Whitehead, S. N., Gangaraju, S., Slinn, J., & Hou, S. T. (2010). Transient and bilateral increase in Neuropilin-1, Fer kinase and collapsin response mediator proteins within membrane rafts following unilateral occlusion of the middle cerebral artery in mouse. *Brain Research*, 1344, 209–216. <https://doi.org/10.1016/j.brainres.2010.05.036>
- Williamson, R., Van Aalten, L., Mann, D. M. A., Platt, B., Plattner, F., Bedford, L., Mayer, J., Howlett, D., Usardi, A., Sutherland, C., & Cole, A. R. (2011). CRMP2 hyperphosphorylation is characteristic of Alzheimer's disease and not a feature common to other neurodegenerative diseases. *Journal of Alzheimer's Disease*, 27(3), 615–625. <https://doi.org/10.3233/JAD-2011-110617>
- Wilson, C. R. E., Charles, D. P., Buckley, M. J., & Gaffan, D. (2007). Fornix transection impairs learning of randomly changing object discriminations. *Journal of Neuroscience*, 27(47), 12868–12873. <https://doi.org/10.1523/JNEUROSCI.3536-07.2007>
- Witter, M. P. (2006). Connections of the subiculum of the rat: Topography in relation to columnar and laminar organization. *Behavioural Brain Research*, 174(2), 251–264. <https://doi.org/10.1016/j.bbr.2006.06.022>
- Wojtowicz, W. M., Wu, W., Andre, I., Qian, B., Baker, D., & Zipursky, S. L. (2007). A Vast Repertoire of Dscam Binding Specificities Arises from Modular Interactions of Variable Ig Domains. *Cell*, 130(6), 1134–1145. <https://doi.org/10.1016/j.cell.2007.08.026>

- Wong, W., & Schlichter, L. C. (2004). Differential Recruitment of Kv1.4 and Kv4.2 to Lipid Rafts by PSD-95. *Journal of Biological Chemistry*, 279(1), 444–452.
<https://doi.org/10.1074/jbc.M304675200>
- Wright, N. F., Erichsen, J. T., Vann, S. D., O'Mara, S. M., & Aggleton, J. P. (2010). Parallel but separate inputs from limbic cortices to the mammillary bodies and anterior thalamic nuclei in the rat. *Journal of Comparative Neurology*, 518(12), 2334–2354.
<https://doi.org/10.1002/cne.22336>
- Xing, H., Lim, Y. A., Chong, J. R., Lee, J. H., Aarsland, D., Ballard, C. G., Francis, P. T., Chen, C. P., & Lai, M. K. P. (2016). Increased phosphorylation of collapsin response mediator protein-2 at Thr514 correlates with β -amyloid burden and synaptic deficits in Lewy body dementias. *Molecular Brain*, 9(1), 1–12. <https://doi.org/10.1186/s13041-016-0264-9>
- Xu, K., Zhong, G., & Zhuang, X. (2013). *Actin, spectrin and associated proteins form a periodic cytoskeletal structure in axons*. <https://doi.org/10.1126/science.1232251>
- Xu, X., Warrington, A. E., Wright, B. R., Bieber, A. J., Van Keulen, V., Pease, L. R., & Rodriguez, M. (2011). A human IgM signals axon outgrowth: Coupling lipid raft to microtubules. *Journal of Neurochemistry*, 119(1), 100–112.
<https://doi.org/10.1111/j.1471-4159.2011.07416.x>
- Yam, P. T., & Charron, F. (2013). Signaling mechanisms of non-conventional axon guidance cues: The Shh, BMP and Wnt morphogens. *Current Opinion in Neurobiology*, 23(6), 965–973. <https://doi.org/10.1016/j.conb.2013.09.002>
- Yamane, M., Yamashita, N., Hida, T., Kamiya, Y., Nakamura, F., Kolattukudy, P., & Goshima, Y. (2017). A functional coupling between CRMP1 and Nav1.7 for retrograde propagation of Semaphorin3A signaling. *Journal of Cell Science*, 130(8), 1393–1403.
<https://doi.org/10.1242/jcs.199737>
- Yamashita, N., Morita, A., Uchida, Y., Nakamura, F., Usui, H., Ohshima, T., Taniguchi, M., Honnorat, J., Thomasset, N., Takei, K., Takahashi, T., Kolattukudy, P., & Goshima, Y. (2007). Regulation of spine development by semaphorin3A through cyclin-dependent kinase 5 phosphorylation of collapsin response mediator protein 1. *Journal of Neuroscience*, 27(46), 12546–12554. <https://doi.org/10.1523/JNEUROSCI.3463-07.2007>

- Yamashita, N., Ohshima, T., Nakamura, F., Kolattukudy, P., Honnorat, J., Mikoshiba, K., & Goshima, Y. (2012). Phosphorylation of CRMP2 (Collapsin Response Mediator Protein 2) is Involved in Proper Dendritic Field Organization. *Journal of Neuroscience*, *32*(4), 1360–1365. <https://doi.org/10.1523/JNEUROSCI.5563-11.2012>
- Yamauchi, K., Yamazaki, M., Abe, M., Sakimura, K., Lickert, H., Kawasaki, T., Murakami, F., & Hirata, T. (2017). Netrin-1 Derived from the Ventricular Zone, but not the Floor Plate, Directs Hindbrain Commissural Axons to the Ventral Midline. *Scientific Reports*, *7*(1). <https://doi.org/10.1038/s41598-017-12269-8>
- Yamazaki, Y., Nagai, J., Akinaga, S., Koga, Y., Hasegawa, M., Takahashi, M., Yamashita, N., Kolattukudy, P., Goshima, Y., & Ohshima, T. (2020). Phosphorylation of CRMP2 is required for migration and positioning of Purkinje cells: Redundant roles of CRMP1 and CRMP4. *Brain Research*, *1736*. <https://doi.org/10.1016/j.brainres.2020.146762>
- Yang, W., Di Vizio, D., Kirchner, M., Steen, H., & Freeman, M. R. (2010). Proteome scale characterization of human S-acylated proteins in lipid raft-enriched and non-raft membranes. *Molecular and Cellular Proteomics*, *9*(1), 54–70. <https://doi.org/10.1074/mcp.M800448-MCP200>
- Yang, X., Zhang, X., Li, Y., Han, S., Howells, D. W., Li, S., & Li, J. (2016). Conventional protein kinase C β -mediated phosphorylation inhibits collapsin response-mediated protein 2 proteolysis and alleviates ischemic injury in cultured cortical neurons and ischemic stroke-induced mice. *Journal of Neurochemistry*, *137*(3), 446–459. <https://doi.org/10.1111/jnc.13538>
- Yao, L., Liu, Y. hua, Li, X., Ji, Y. hong, Yang, X. jing, Hang, X. ting, Ding, Z. mei, Liu, F., Wang, Y. hua, & Shen, A. guo. (2016). CRMP1 Interacted with Spy1 During the Collapse of Growth Cones Induced by Sema3A and Acted on Regeneration After Sciatic Nerve Crush. *Molecular Neurobiology*, *53*(2), 879–893. <https://doi.org/10.1007/s12035-014-9049-2>
- Yazawa, K., Nakamura, F., Masukawa, D., Sato, S., Hiroshima, Y., Yabushita, Y., Mori, R., Matsuyama, R., Kato, I., Taniguchi, H., Goshima, Y., & Endo, I. (2020). Low Incidence of High-Grade Pancreatic Intraepithelial Neoplasia Lesions in a Crmp4 Gene-Deficient Mouse Model of Pancreatic Cancer. *Translational Oncology*, *13*(3). <https://doi.org/10.1016/j.tranon.2020.100746>

- Yazdani, U., & Terman, J. R. (2006). The semaphorins. *Genome Biology*, 7(3).
<https://doi.org/10.1186/gb-2006-7-3-211>
- Ye, X., Qiu, Y., Gao, Y., Wan, D., & Zhu, H. (2019). A subtle network mediating axon guidance: Intrinsic dynamic structure of growth cone, attractive and repulsive molecular cues, and the intermediate role of signaling pathways. *Neural Plasticity*, 2019.
<https://doi.org/10.1155/2019/1719829>
- Yoshida, H., Watanabe, A., & Ihara, Y. (1998). *Collapsin Response Mediator Protein-2 Is Associated with Neurofibrillary Tangles in Alzheimer's Disease**. <http://www.jbc.org>
- Yoshida, Y. (2012). Semaphorin Signaling in Vertebrate Neural Circuit Assembly. *Frontiers in Molecular Neuroscience*, 5(June), 1–16. <https://doi.org/10.3389/fnmol.2012.00071>
- Yoshihara, S., Jiang, X., Morikawa, M., Ogawa, T., Ichinose, S., Yabe, H., Kakita, A., Toyoshima, M., Kunii, Y., Yoshikawa, T., Tanaka, Y., & Hirokawa, N. (2021). Betaine ameliorates schizophrenic traits by functionally compensating for KIF3-based CRMP2 transport. *Cell Reports*, 35(2), 108971. <https://doi.org/10.1016/j.celrep.2021.108971>
- Yoshimura, T., Kawano, Y., Arimura, N., Kawabata, S., Kikuchi, A., & Kaibuchi, K. (2005). GSK-3 β regulates phosphorylation of CRMP-2 and neuronal polarity. *Cell*, 120(1), 137–149. <https://doi.org/10.1016/j.cell.2004.11.012>
- Yu-Kemp, H. C., & Briehar, W. M. (2016). Collapsin response mediator protein-1 regulates Arp2/3-dependent actin assembly. *Journal of Biological Chemistry*, 291(2), 658–664.
<https://doi.org/10.1074/jbc.C115.689265>
- Yuasa-Kawada, J., Suzuki, R., Kano, F., Ohkawara, T., Murata, M., & Noda, M. (2003). Axonal morphogenesis controlled by antagonistic roles of two CRMP subtypes in microtubule organization. *European Journal of Neuroscience*, 17(11), 2329–2343.
<https://doi.org/10.1046/j.1460-9568.2003.02664.x>
- Zabroski, I. O., & Nugent, M. A. (2021). Lipid raft association stabilizes VEGF receptor 2 in endothelial cells. *International Journal of Molecular Sciences*, 22(2), 1–15.
<https://doi.org/10.3390/ijms22020798>
- Zahajszky, J., Dickey, C. C., McCarley, R. W., Fischer, I. A., Nestor, P., Kikinis, R., & Shenton, M. E. (2001). A quantitative MR measure of the fornix in schizophrenia.

Schizophrenia Research, 47(1), 87–97. [https://doi.org/10.1016/S0920-9964\(00\)00051-7](https://doi.org/10.1016/S0920-9964(00)00051-7)

Zhang, J. N., Michel, U., Lenz, C., Friedel, C. C., Köster, S., D'Hedouville, Z., Tönges, L., Urlaub, H., Bähr, M., Lingor, P., & Koch, J. C. (2016). Calpain-mediated cleavage of collapsin response mediator protein-2 drives acute axonal degeneration. *Scientific Reports*, 6. <https://doi.org/10.1038/srep37050>

Zhang, J., Zhao, B., Zhu, X., Li, J., Wu, F., Li, S., Gong, X., Cha, C., & Guo, G. (2018). Phosphorylation and SUMOylation of CRMP2 regulate the formation and maturation of dendritic spines. *Brain Research Bulletin*, 139, 21–30. <https://doi.org/10.1016/j.brainresbull.2018.02.004>

Zhang, S., Su, Y., Shinmyo, Y., Islam, S. M., Naser, I. Bin, Ahmed, G., Tamamaki, N., & Tanaka, H. (2010). Draxin, a repulsive axon guidance protein, is involved in hippocampal development. *Neuroscience Research*, 66(1), 53–61. <https://doi.org/10.1016/j.neures.2009.09.1710>

Zhang, Z., Ottens, A. K., Sadasivan, S., Kobeissy, F. H., Fang, T., Hayes, R. L., & Wang, K. K. W. (2007). Calpain-mediated collapsin response mediator protein-1, -2, and -4 proteolysis after neurotoxic and traumatic brain injury. *Journal of Neurotrauma*, 24(3), 460–472. <https://doi.org/10.1089/neu.2006.0078>

Zheng, Y., Sethi, R., Mangala, L. S., Taylor, C., Goldsmith, J., Wang, M., Masuda, K., Karaminejadranjbar, M., Mannion, D., Miranda, F., Herrero-Gonzalez, S., Hellner, K., Chen, F., Alsaadi, A., Albukhari, A., Fotso, D. C., Yau, C., Jiang, D., Pradeep, S., ... Ahmed, A. A. (2018). Tuning microtubule dynamics to enhance cancer therapy by modulating FER-mediated CRMP2 phosphorylation. *Nature Communications*, 9(1). <https://doi.org/10.1038/s41467-017-02811-7>

Zhou, M. H., Yang, G., Jiao, S., Hu, C. L., & Mei, Y. A. (2012). Cholesterol enhances neuron susceptibility to apoptotic stimuli via cAMP/PKA/CREB-dependent up-regulation of Kv2.1. *Journal of Neurochemistry*, 120(4), 502–514. <https://doi.org/10.1111/j.1471-4159.2011.07593.x>

Zhu, D., Xiong, W. C., & Mei, L. (2006). Lipid rafts serve as a signaling platform for nicotinic acetylcholine receptor clustering. *Journal of Neuroscience*, 26(18), 4841–4851. <https://doi.org/10.1523/JNEUROSCI.2807-05.2006>

- Zhu, L. Q., Zheng, H. Y., Peng, C. X., Liu, D., Li, H. A., Wang, Q., & Wang, J. Z. (2010). Protein phosphatase 2A facilitates axonogenesis by dephosphorylating CRMP2. *Journal of Neuroscience*, *30*(10), 3839–3848. <https://doi.org/10.1523/JNEUROSCI.5174-09.2010>
- Zhu, Y., Guthrie, S., & Murakami, F. (2006). Ephrin A/EphA controls the rostral turning polarity of a lateral commissural tract in chick hindbrain. *Development*, *133*(19), 3837–3846. <https://doi.org/10.1242/dev.02564>
- Ziak, J., Weissova, R., Jeřábková, K., Janikova, M., Maimon, R., Petrasek, T., Pukajova, B., Kleisnerova, M., Wang, M., Brill, M. S., Kasperek, P., Zhou, X., Alvarez-Bolado, G., Sedlacek, R., Misgeld, T., Stuchlik, A., Perlson, E., & Balastik, M. (2020). CRMP 2 mediates Sema3F-dependent axon pruning and dendritic spine remodeling . *EMBO Reports*, *21*(3). <https://doi.org/10.15252/embr.201948512>

Annexe

Article 3

Beyond Neuronal Microtubule Stabilization: MAP6 and CRMPS, Two Converging Stories

Camille Cuveillier, Benoit Boulan, Charlotte Ravanello, Eric Denarier, Jean-Christophe Deloulme, Sylvie Gory-Fauré, Christian Delphin, Christophe Bosc, Isabelle Arnal, Annie Andrieux

Frontiers in Molecular Neurosciences 2021 doi: 10.3389/fnmol.2021.665693

Résumé de l'article

Le cytosquelette de microtubules et d'actine est un acteur essentiel à de nombreux processus cellulaires et neurodéveloppementaux. Il intervient dans la mise en place du système nerveux central en jouant un rôle crucial au cours des différentes étapes de prolifération, de migration, de différenciation des neurones et dans l'établissement de connexions entre eux. La compréhension des mécanismes régulant le cytosquelette a fait l'objet d'un nombre considérable d'études, conduisant à la caractérisation, entre autres, de protéines rassemblées sous la dénomination de MAP (Microtubules-Associated Protein). Cependant, depuis une vingtaine d'années l'idée a émergé selon laquelle, outre leur rôle dit structural de régulation de la dynamique et de la stabilité des microtubules, les MAP peuvent également être impliquées dans des fonctions cellulaires très diverses. La protéine MAP6, découverte par l'équipe de Didier Job est un exemple probant illustrant parfaitement la polyvalence des MAP et leurs diverses propriétés cellulaires. En effet, hormis ses fonctions directement liées aux microtubules, MAP6 est capable d'interagir avec l'actine et de favoriser la formation de filaments, un mécanisme nécessaire à la maturation des épines dendritiques mais agit aussi sur des régulateurs de l'actine comme les Rho GTPases à travers des cascades de signalisation. En dehors du cytosquelette, MAP6 a été retrouvée localisée à l'intérieur de compartiments membranaires au niveau du golgi, de vésicules sécrétoires, des mitochondries ainsi que dans la membrane plasmique où elle participe à l'homéostasie des canaux calciques. De plus, MAP6 lie le complexe tripartite de récepteurs de la sémaphorine 3E et est impliquée dans la croissance axonale induite par cette molécule de guidage. A l'échelle de l'animal, l'étude de souris MAP6 KO a révélé une absence de développement du fornix permettant de mettre en lumière le rôle de MAP6 dans la connectivité neuronale. Une altération de la transmission et de la plasticité synaptiques a également été constatée chez ces souris, corrélée avec des défauts du comportement ainsi qu'une perturbation de la neurogénèse adulte. Ces souris sont aujourd'hui des modèles d'étude de pathologies psychiatriques comme la schizophrénie ou la dépression. Les avancées de la recherche sur les MAP structurales et MAP6 en particulier ont donc montré que leurs fonctions ne se limitaient pas à la régulation des microtubules. A l'inverse d'autres familles de protéines comme les CRMP (Collapsin Response Mediator Proteins), à l'origine identifiées en tant qu'acteurs de cascades de signalisation se sont révélés pouvoir effectuer des fonctions de MAP structurales. Les CRMP sont impliquées majoritairement dans les mécanismes de collapse du cône de croissance mais aussi dans la stimulation de la croissance des épines dendritiques médiées par une molécule de guidage, la sémaphorine 3A. Leur rôle

dans cette signalisation est régulé via leur phosphorylation par plusieurs kinases comme Cdk5 et GSK3 β qui va bloquer leur capacité à se lier aux microtubules, conduisant à l'effondrement du cône de croissance. Plus récemment il a été montré chez CRMP2 que cette protéine était à la fois capable de lier la tubuline soluble pour favoriser la polymérisation des microtubules mais également de stabiliser les microtubules polymérisés. Les CRMP sont également capables de réguler la dynamique de l'actine en interagissant avec elle de manière directe ou indirectement via par exemple des protéines de la famille des VASP. A travers ces interactions avec le cytosquelette, les CRMP jouent un rôle crucial dans la formation et l'élongation des axones ainsi que dans la motilité du cône de croissance. Les CRMP sont également présentes au niveau de compartiments membranaires et sont connues pour moduler les fonctions de canaux sodiques et de canaux calciques ainsi que pour interagir avec certaines plexines, des récepteurs de molécules de guidage. L'étude des souris CRMP KO a mis en évidence la présence de défauts dans l'organisation des dendrites de plusieurs régions du cerveau de ces animaux, ainsi qu'une altération de la plasticité synaptique corrélée avec des troubles de l'apprentissage et de la mémoire. Chez l'homme de nombreuses publications ont établi un lien entre les CRMP et des maladies psychiatriques comme la schizophrénie. En conclusion, les MAP structurales, présentées ici à travers les exemples de MAP6 et CRMP, sont en réalité des protéines très polyvalentes avec de multiples partenaires et fonctions, jouant des rôles majeurs dans plusieurs mécanismes cérébraux. La classification originale de ces protéines en tant que MAP était basée sur leur capacité à se lier aux microtubules. Cette liaison participe à la stabilité des microtubules, mais elle pourrait également permettre d'assurer la localisation spatiale et temporelle spécifique de ces MAP pour leur permettre d'interagir avec d'autres protéines et de prendre part à la propagation de signaux ou à la régulation de la composition protéique de compartiments cellulaires. Cette double capacité des MAP à stabiliser les microtubules et à les utiliser comme moyen d'accéder à différentes régions de la cellule pour assurer d'autres fonctions fait qu'il est expérimentalement impossible de distinguer leurs fonctions liées aux microtubules et celles qui ne le seraient pas. Au sein de cette revue j'ai majoritairement contribué à la rédaction des parties ayant trait aux diverses fonctions des CRMP.



Beyond Neuronal Microtubule Stabilization: MAP6 and CRMPs, Two Converging Stories

Camille Cuveillier, Benoit Boulan, Charlotte Ravello, Eric Denarier, Jean-Christophe Deloulme, Sylvie Gory-Fauré, Christian Delphin, Christophe Bosc, Isabelle Arnal* and Annie Andrieux*

Univ. Grenoble Alpes, Inserm U1216, CEA-IRIG, CNRS, Grenoble Institut Neurosciences, Grenoble, France

OPEN ACCESS

Edited by:

David Blum,
INSERM U1172 Centre de
Recherche Jean Pierre Aubert,
France

Reviewed by:

Christian Gonzalez-Billaut,
University of Chile, Chile
C Laura Sayas,
University of La Laguna, Spain

*Correspondence:

Annie Andrieux
annie.andrieux@univ-grenoble-
alpes.fr
Isabelle Arnal
isabelle.arnal@univ-grenoble-alpes.fr

Specialty section:

This article was submitted to
Molecular Signalling and Pathways,
a section of the journal
Frontiers in Molecular Neuroscience

Received: 08 February 2021

Accepted: 09 April 2021

Published: 05 May 2021

Citation:

Cuveillier C, Boulan B, Ravello C,
Denarier E, Deloulme J-C,
Gory-Fauré S, Delphin C, Bosc C,
Arnal I and Andrieux A (2021) Beyond
Neuronal Microtubule Stabilization:
MAP6 and CRMPs, Two
Converging Stories.
Front. Mol. Neurosci. 14:665693.
doi: 10.3389/fnmol.2021.665693

The development and function of the central nervous system rely on the microtubule (MT) and actin cytoskeletons and their respective effectors. Although the structural role of the cytoskeleton has long been acknowledged in neuronal morphology and activity, it was recently recognized to play the role of a signaling platform. Following this recognition, research into Microtubule Associated Proteins (MAPs) diversified. Indeed, historically, structural MAPs—including MAP1B, MAP2, Tau, and MAP6 (also known as STOP);—were identified and described as MT-binding and -stabilizing proteins. Extensive data obtained over the last 20 years indicated that these structural MAPs could also contribute to a variety of other molecular roles. Among multi-role MAPs, MAP6 provides a striking example illustrating the diverse molecular and cellular properties of MAPs and showing how their functional versatility contributes to the central nervous system. In this review, in addition to MAP6's effect on microtubules, we describe its impact on the actin cytoskeleton, on neuroreceptor homeostasis, and its involvement in signaling pathways governing neuron development and maturation. We also discuss its roles in synaptic plasticity, brain connectivity, and cognitive abilities, as well as the potential relationships between the integrated brain functions of MAP6 and its molecular activities. In parallel, the Collapsin Response Mediator Proteins (CRMPs) are presented as examples of how other proteins, not initially identified as MAPs, fall into the broader MAP family. These proteins bind MTs as well as exhibiting molecular and cellular properties very similar to MAP6. Finally, we briefly summarize the multiple similarities between other classical structural MAPs and MAP6 or CRMPs. In summary, this review revisits the molecular properties and the cellular and neuronal roles of the classical MAPs, broadening our definition of what constitutes a MAP.

Keywords: microtubule, microtubule-associated-proteins, actin, neuron, synapse, psychiatric disease, cognition

INTRODUCTION

Microtubule-Associated Proteins (MAPs) were discovered in the context of the study of microtubule (MT) stability in neurons during the 1970s (Weingarten et al., 1975; Sloboda et al., 1976). Indeed, in neurons, MTs composed of α - and β -tubulin heterodimers forming 25 nm wide hollow tubes can either exhibit dynamic properties with phases of

polymerization/depolymerization (Mitchison and Kirschner, 1984), or be particularly stable with a slow tubulin turnover (Okabe and Hirokawa, 1990; Li and Black, 1996). In testimony to their stability, neuronal MTs can resist conditions usually causing MT depolymerization, such as exposure to tubulin poison (nocodazole) or to cold temperatures (Webb and Wilson, 1980; Brady et al., 1984; Baas and Black, 1990). The search for the neuronal effectors leading to this stability has long been a focus of research. Various factors were shown to modulate neuronal MT stability, including: (1) the nature of tubulin isotypes, (2) post-translational tubulin modifications, and (3) binding of MAPs (Baas et al., 2016).

The nature of tubulin isotypes was clearly demonstrated in mice, where α and β tubulin are each coded by eight genes (Findeisen et al., 2014; Hausrat et al., 2020). The different isoforms combine to produce MTs with distinct dynamic parameters. For example, the β III/ β II tubulin MT isoform displays antagonist effects on dynamicity/stability (Panda et al., 1994; Pamula et al., 2016; Vemu et al., 2016; Ti et al., 2018).

Post-translational modifications of tubulin—including tyrosination, polyamination, polyglutamylation, and acetylation—were shown to modulate MT stability by altering their dynamic properties (Moutin et al., 2020), resistance to cold exposure (Song et al., 2013), sensitivity to severing enzymes (Lacroix et al., 2010; Valenstein and Roll-Mecak, 2016), and flexibility (Portran et al., 2017; Xu et al., 2017). Finally, the so-called structural MAPs which bind throughout the MT lattice also influence MT stabilization. As indicated above, these structural MAPs were first discovered in the 1970s, when they were found to be associated with purified brain tubulin preparations. The group includes MAP1, MAP2, MAP4, Tau, and MAP6 (also known as STOP; Cleveland et al., 1977; Herzog and Weber, 1978; Huber and Matus, 1984; Margolis et al., 1986; Job et al., 1987; Chapin and Bulinski, 1994). Other members were identified more recently: DCX, MAP7, and MAP9 (Gleeson et al., 1999; Yadav et al., 2014; Monroy et al., 2020).

Since the initial discovery of these MAPs based on their ability to bind and stabilize MTs, studies have increasingly pointed toward a wide array of other cellular functions (Dehmelt and Halpain, 2005; Morris et al., 2011; Dent and Baas, 2014; Bodakuntla et al., 2019). Thus, structural MAPs have been shown to: regulate actin cytoskeleton dynamics; be amenable to post-translational modifications which target them to membrane compartments; interact with a huge number of partners which are then involved in neuroreceptor homeostasis and signaling cascades. These additional abilities stem from molecular features including actin-binding domains, stretches of cysteine residues for palmitoylation-driven membrane association, and Proline-Rich-Domain (PRDs) to mediate binding to SH3-containing signaling proteins.

In this review, we will present results obtained over almost 40 years of research on MAP6 proteins to illustrate the wide range of MT-dependent and -independent molecular properties that MAPs can exhibit. Using the Collapsin Response Mediator Proteins (CRMPs) as an example, we will show how other proteins not initially identified as MAPs also fulfill molecular and cellular functions initially attributed to the classical

structural MAPs. We will also discuss the multiple cellular and physiological roles of MAPs in neurons and in the central nervous system. The review will, in particular, illustrate the crucial implication of MAPs in neuronal plasticity and cognition in accordance with their dysfunctions in neuropsychiatric diseases. Overall, we aim at demonstrating that the initial definition of classical MAPs (i.e., MT binding and stabilization) should now encompass the MT-dependent and -independent functions of these proteins.

MAP6 PROTEIN IS A MULTI-FUNCTIONAL PROTEIN

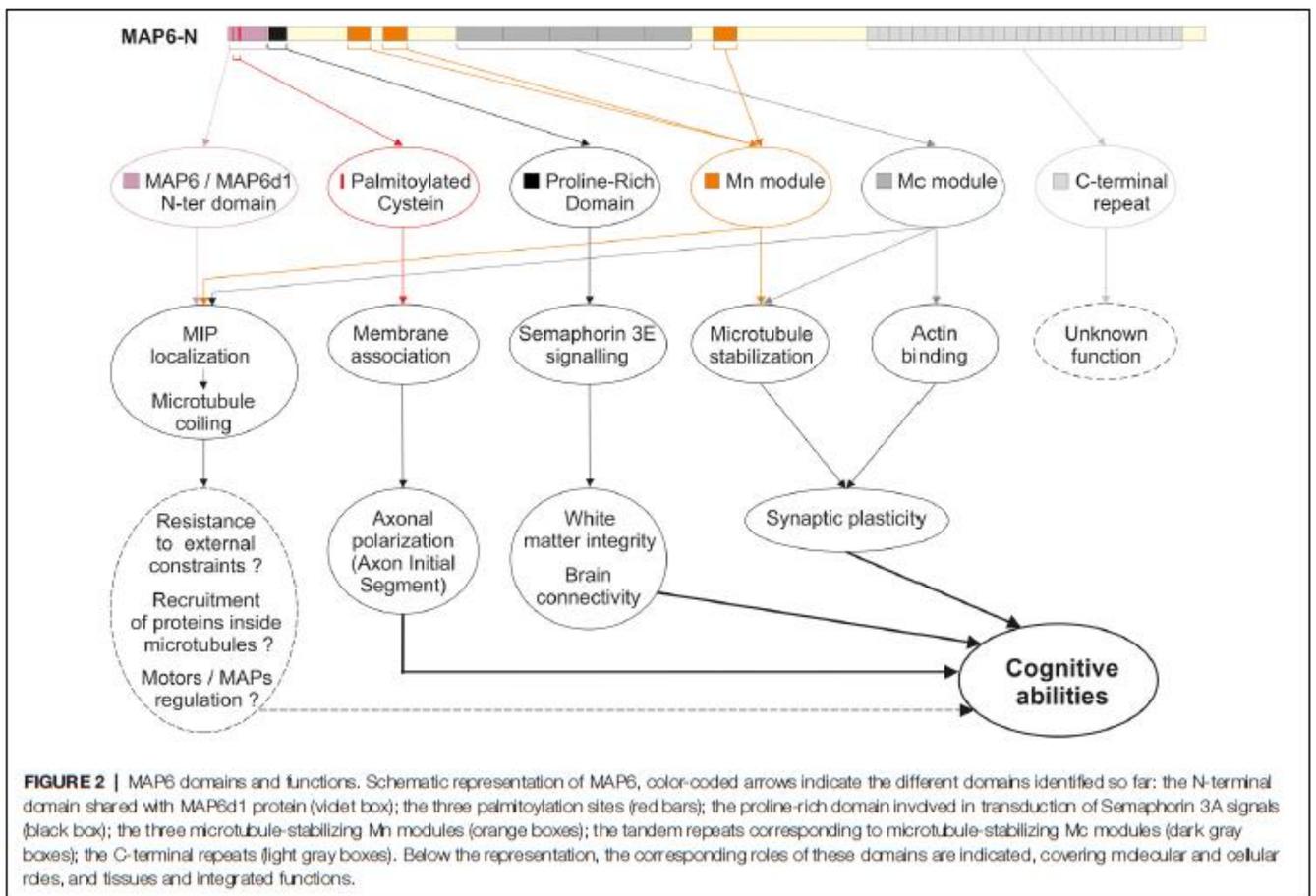
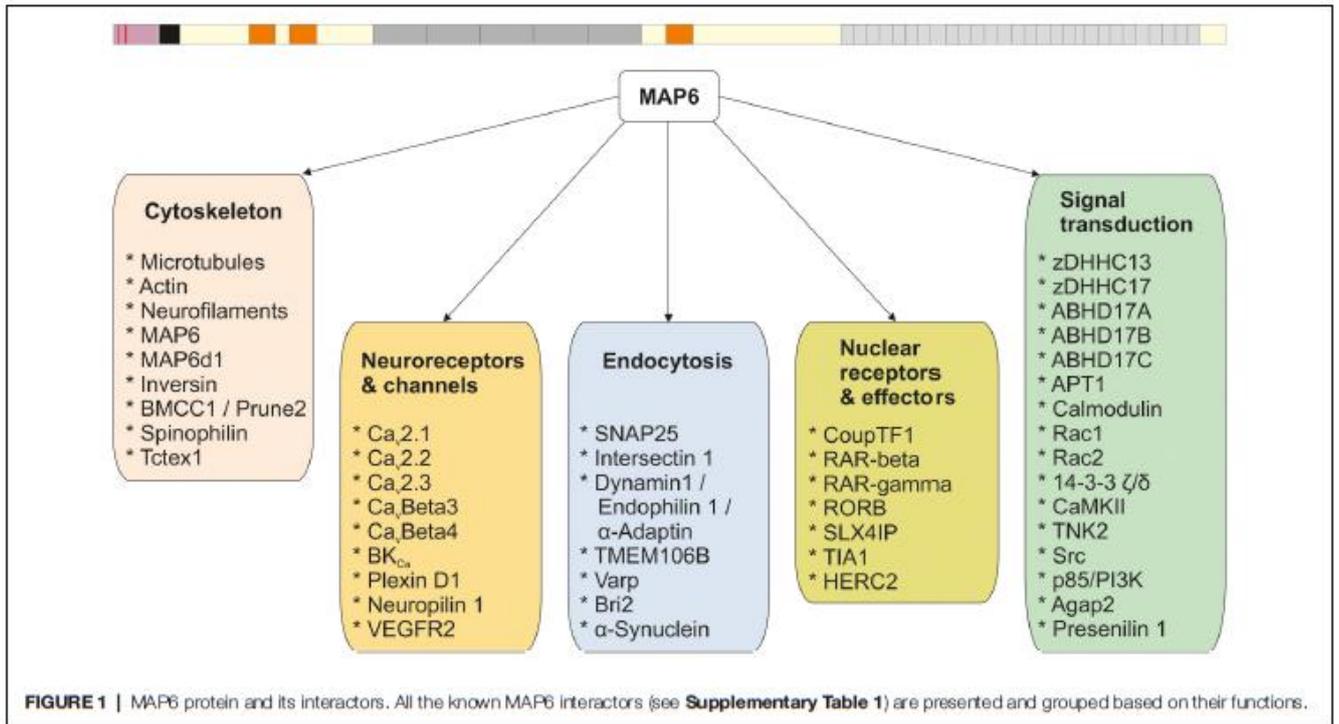
Like the other structural MAPs, MAP6 protein was initially identified thanks to its ability to interact with tubulin/MTs. Subsequent studies identified a large number of MAP6 partners related to various cellular functions including neuroreceptor homeostasis, endocytosis, nuclear function, and signaling pathways. The different partners are summarized in Figure 1, and further details are provided in Supplementary Table 1. In the following sections, the contribution of each MAP6 sub-domain to its molecular, cellular, and physiological functions are detailed. A summary of MAP6 domains and their roles is presented in Figure 2.

MAP6 Binds and Stabilizes Microtubules Discovery of MAP6 as a Microtubule (MT)-Associated Protein

The exceptional stability of brain-extracted MTs when exposed to cold was first described almost half a century ago (Brinkley and Cartwright, 1975; Lee et al., 1975; Webb and Wilson, 1980). Subsequent work led to the identification of several polypeptides that co-purify with cold-stable MTs (Job et al., 1981, 1982; Margolis and Rauch, 1981; Pabion et al., 1984) and are retained on calmodulin-affinity columns (Job et al., 1982; Pirollet et al., 1983). The unique ability of these polypeptides to confer cold stability on MTs led Job and collaborators to call them STOP proteins, for Stable-Tubule-Only Polypeptides (they were later renamed MAP6 proteins). The MT stabilization properties of MAP6 are Ca^{2+} -calmodulin sensitive (Job et al., 1981; Pirollet et al., 1983, 1992a,b) and the 145-kDa STOP isoform from the rat brain was shown to confer a super-stable state on MTs, in a dose-dependent manner (Job et al., 1987).

Molecular Cloning of MAP6 and Identification of MAP6 Isoforms

Bosc et al. (1996) first cloned MAP6 cDNA by immunoscreening of a DNA expression library with MAP6 monoclonal antibodies (Pirollet et al., 1989). These experiments provided clear identification of MAP6 and made further studies to gather specific information on the protein possible. MAP6 isoforms are restricted to vertebrates, where they are expressed in several tissues (Pirollet et al., 1989; Bosc et al., 2001). In mice, a single four-exon gene, *Map6* (formerly *Mtap6*), produces several isoforms of MAP6 proteins as a result of RNA splicing and the use of alternative promoters (Bosc et al., 1996; Denarier et al., 1998a; Aguezoul et al., 2003). Murine neurons express MAP6-E



(MAP6-Early, formerly E-STOP, apparent MW 79 kDa) from early developmental stages to adulthood at constant expression levels, whereas expression of the longest isoform MAP6-N (MAP6-Neuronal, formerly N-STOP, apparent MW 120 kDa) increases between birth and adulthood (up to 10-fold higher expression than MAP6-E in adults) (Guillaud et al., 1998; Galiano et al., 2004; Tortosa et al., 2017). These two variants can be found associated with MTs in neurons and stabilize neuronal MTs when exposed to cold or nocodazole (Pirollet et al., 1989; Margolis et al., 1990; Bosc et al., 1996; Guillaud et al., 1998; Andrieux et al., 2002). Glial cells also express some MAP6 isoforms, with MAP6-O (apparent MW 89 kDa) found in oligodendrocytes, where they provide resistance to both cold and nocodazole. In contrast, astrocytes express MAP6-A (apparent MW 66 kDa), which only provides cold resistance (Galiano et al., 2004). Like MAP6-A, the ubiquitous MAP6-F isoform (apparent MW 42 kDa) provides only cold resistance (Denarier et al., 1998b).

Identification of MAP6 MT-Binding Domains and Their Role in MT Stabilization

The identification of 12 calmodulin-binding domains on MAP6-N revealed the existence of three domains that partially overlap some of the calmodulin-binding motifs. These three domains are known as Mn modules (Mn1–3, Figure 2) and stabilize MTs against both cold and nocodazole-induced depolymerization (Bosc et al., 2001). Mn1 and Mn2 modules were shown to reproduce the function of full-length MAP6-N with regard to MT stabilization, both *in vitro* and *in cellulo* (Bosc et al., 2001; Lefevre et al., 2013). Thus, these modules may stabilize MTs exposed to cold and nocodazole by forming bridges with adjacent tubulin heterodimers either between protofilaments, or longitudinally within the same protofilament (Lefevre et al., 2013).

In addition to its Mn modules, MAP6-N contains central repeats, or Mc modules, each of which encompass a calmodulin-binding domain (Figure 2). As indicated above, MAP6 proteins are found only in vertebrates, but Mc modules are further restricted. Thus, these domains have only been identified in mammals and are absent from MAP6 homologs expressed in fish, frogs, lizards or birds (Bosc et al., 2001, 2003). Among mammals, the number of Mc modules varies depending on the species and/or individual (4–6 in non-inbred rats, 3–6 in mice depending on the strain, and only 1 in higher primates) (Bosc et al., 2003). Mc modules have been shown to be responsible for conferring cold-stability of MTs in cells, even though they display no MT-binding capacity at physiological temperatures (Denarier et al., 1998b; Delphin et al., 2012). *In vitro* studies demonstrated that cold temperatures induce conformational changes in the Mc modules which allow them to interact with MTs (Delphin et al., 2012). Thus, Mc modules behave like cold sensors, stabilizing MTs when temperatures drop, for example during hibernation or torpor.

The high abundance of calmodulin-binding domains overlapping the Mn and Mc modules in MAP6 hints that MAP6 binding to MTs is likely to be tightly regulated in cells. Indeed, it was shown *in vitro* that Ca²⁺-Calmodulin (CaM)

binding to MAP6 occurs in an unusual manner (Bouvier et al., 2003) and prevents MAP6 binding to MTs (Lefevre et al., 2013). MAP6/MTs interaction is also prevented by phosphorylation of MAP6 by CAMKII and favors MAP6/F-actin interaction in neurons (Baratier et al., 2006). Based on the available experimental data and as proposed by Ramkumar and collaborators (Ramkumar et al., 2018), the regulation of MAP6 by Ca²⁺-CaM in dendritic spines might follow this sequence: upon synaptic activity, the Ca²⁺-CaM complex forms, detaches MAP6 from adjacent MTs and activates CAMKII (Fink and Meyer, 2002). When Ca²⁺ level decreases, CaM is released from MAP6 allowing its phosphorylation by CAMKII. Then phosphorylated MAP6 is unable to re-associate with MTs but rather binds and stabilizes the synaptic F-actin (Baratier et al., 2006; Peris et al., 2018).

Recently, in cell-free systems, recombinant MAP6-N was shown to exert some stabilizing effects on MT dynamics by promoting rescue (Cuveillier et al., 2020), although the precise contribution of the various MAP6-N MT-binding domains (Mn and/or Mc modules) remains to be clarified. Indeed, the specific role of MAP6-related MT stabilization in developing neurons remains unclear. For example, MT-dependent parameters of neuronal differentiation and morphology (e.g., neurite elongation and branching, axonal polarization) are not dramatically altered in neurons expressing reduced MAP6 levels. Indeed, MAP6 deficient neurons exhibited only moderate morphological defects with a slight increase of the axonal length and a decreased spine density (Andrieux et al., 2002, 2006; Peris et al., 2018; Boulan et al., 2020), as well as a reduced growth cone size and an increased dendrite branching (Schwenk et al., 2014; Qiang et al., 2018). Those defects are not striking possibly due to compensatory mechanisms by other MAPs. Indeed, double-KO neurons for Tau/MAP1B or MAP2/MAP1B display stronger alterations of neuronal differentiation (Takei et al., 2000; Teng et al., 2001) than single KO neurons (Harada et al., 1994; Takei et al., 1997; Gonzalez-Billault et al., 2001). In this respect, an increased expression of Tau has been observed when MAP6 expression is knocked-down even though Tau and MAP6 role in MT stabilization are not similar in neurons (Qiang et al., 2018). In developing neurons, MAP6 was found enriched in the proximal part of the future axon (Tortosa et al., 2017) and a recent proteomic analysis pointed out MAP6 as a specific component of the AIS (Hamdan et al., 2020). MAP6-N localization in the proximal part of axons has been shown to be protective toward the formation of axonal varicosities induced by mechanical stress (Gu et al., 2017). Still, the exact relationships between MAP6-dependent MT stabilization, axonal polarization and AIS functions remains elusive.

MAP6 Belongs to a Family of Proteins

Although most structural MAPs exhibit repeated MT-binding motifs, the repeated motifs in MAP6—its Mn and Mc modules—are unique, and share no homology with MT-binding domains found in Tau or MAP1B (Bosc et al., 1996). However, bioinformatic analysis of the MAP6 sequence has revealed three proteins that share homology in MAP6 functional domains.

The first one is MAP6d1, for MAP6-domain-containing protein 1 (formerly SL21 for 21-kDa STOP-like protein). MAP6d1 is expressed at high levels in the brain and shares two major similarities with MAP6: 80% sequence homology in its N-terminal domain, and 72% sequence homology with the Mn3 module of MAP6 (Bosc et al., 2001; Gory-Fauré et al., 2006). Since the N-terminal domain of both proteins contains the main calmodulin-binding site (Bosc et al., 2001), its functional role might be important.

The original MAP6 family was enlarged following the discovery of homologs of SAXO proteins (SAXO1 and SAXO2 in mammals, formerly named FAM154A and FAM154B, respectively). These proteins were originally identified in the protozoan *Trypanosoma brucei* and in ciliated/flagellated cells (Dacheux et al., 2012). Like neuronal MTs, cilia and flagella are characterized by a high level of MT stability displaying resistance to cold- and nocodazole-induced depolymerization. The human isoform hSAXO1 is ubiquitously expressed and specifically associates with centrioles, basal bodies and cilia (Dacheux et al., 2015). Little is known about SAXO2 beyond the fact that its expression appears to be enriched in ciliated cells.

SAXO proteins share homologies with the Mn modules of MAP6/MAP6d1, and their N-terminal sequence, although distinct, is also rich in cysteines (Dacheux et al., 2012). Interestingly, 80% of hSAXO1 consists of 12 tandem Mn modules that, like the equivalent modules in MAP6 and MAP6d1, are involved in MT binding and cold stabilization. The high number of Mn modules is important since hSAXO1 overexpression results in an increased primary cilia length in RPE1 cells, through a mechanism requiring the Mn modules (Dacheux et al., 2015).

MAP6 Is a Microtubule Inner Protein (MIP)

Cryo-EM experiments revealed neuronal MTs to contain visible intraluminal densities (Burton, 1984; Garvalov et al., 2006; Atherton et al., 2018). These densities correspond to Microtubule Inner Proteins (MIPs), the molecular identity of which was totally unknown until MAP6 was identified as a MIP (Cuvellier et al., 2020). The capacity of MAP6 to enter the lumen of MTs was demonstrated using cell-free systems in which MTs were copolymerized with MAP6, yielding MTs with regularly spaced intraluminal densities. When using MTs derived from murine MAP6 KO neurons, a net reduction in the numbers of intraluminal densities was observed. The presence of MAP6 inside MTs would explain, in part, the extremely slow turnover of MAP6 on neuronal microtubules described by Tortosa et al. (2017). Strikingly, intraluminal MAP6 induced MT coiling *in vitro*, leading to the formation of helical MTs with a highly conserved pitch and width associated with a specific tubulin compaction state in the MT lattice. This coiling pattern requires the Mn and Mc modules, as well as the first 35 N-terminal residues.

In neurons, the functions of such stable helical MAP6-containing MTs remains to be determined. By occupying a greater width, helical MTs could influence the spatial organization of the MT network, help determine neurite or axonal width, or confer resistance to compressive loads, such as those encountered during development. The unhabitual

tubulin compaction state of helical MTs could also be a mean to specifically recruit a set of proteins such as molecular motors.

From an evolutionary point of view, it will be interesting to discover when did the ability of mammalian neuronal MAP6 to behave as a MIP emerge? In other words, does the MAP6 ancestor SAXO in *Trypanosoma* (Dacheux et al., 2012) behave as a MIP only, as a MAP only, or does it exhibit both properties?

MAP6 Associates With Actin

The first indication that MAP6 can bind to actin was obtained when CaMKII-phosphorylated MAP6 was found to be unable to bind MTs, but that it binds actin *in vitro* and in the growth cones of neurons (Baratier et al., 2006). More recently, the central Mc modules of MAP6 were shown to bind actin and to induce specific rearrangements—leading to straightening and bundling of actin filaments (Peris et al., 2018). Moreover, MAP6-mediated stabilization of synaptic actin following synaptic activation was shown to be crucial for maintaining mature dendritic spines, the postsynaptic compartments of synapses (Peris et al., 2018). Other effects of MAP6 on the dynamic parameters of actin, such as nucleation, remain to be investigated, as does the possibility that MAP6 mediates cross-linking between actin and MT networks in neurons. MAP6 may also indirectly influence the actin cytoskeleton through an effect on signaling cascades as it has been shown to interact with the small GTPase protein Rac2 (Figure 1; Capala et al., 2015). Several MAP6 partners have also been shown to interact with actin (Supplementary Table 1), such as spinophilin (Grossman et al., 2004) or α -synuclein (Oliveira da Silva and Liz, 2020). These interactions support specific actin-related cellular functions for MAP6 and its partners.

MAP6 Associates With Membranes and Neuroreceptors

MAP6 and Membranous Compartments

The N-terminal domains of MAP6 and MAP6d1 contain a stretch of cysteines with C5, C10, and C11 residues (Figure 2). These positions have been shown to be palmitoylated by a subset of palmitoylating enzymes containing a DHHC motif. The proteins are then targeted to the Golgi apparatus or the plasma membrane (Gory-Fauré et al., 2006, 2014). In addition, MAP6 interacts directly with ankyrin repeats present in the palmitoylating enzymes zDHHC13 and zDHHC17 (Lemonidis et al., 2015). During neuronal development, palmitoylated forms of MAP6 were identified on the Golgi and on secretory vesicles, and depalmitoylation by α/β hydrolase-domain-containing 17 proteins (ABHD17 proteins) induced MAP6 relocation to MTs in the proximal part of the axon (Tortosa et al., 2017). In neurons, non-centrosomal MT nucleation is crucial, and through its interactions with MTs as well as with the Golgi apparatus or Golgi outposts which are nucleation sites for non-centrosomal MTs (Sanders and Kaverina, 2015; Valenzuela et al., 2020; Yang and Wildonger, 2020), MAP6 might contribute to such events.

MAP6 and MAP6d1 proteins were also shown to localize to mitochondria. This localization involved their N-terminal domain, but not palmitoylation (Gory-Fauré et al., 2014).

Finally, indirect evidence links MAP6 to lysosomes: KIF5B (Kinesin 1 heavy-chain) preferentially binds to MAP6-positive MTs (Tortosa et al., 2017) and lysosomal transport—which is dependent on KIF5B and on TMEM106B, a MAP6 partner (Figure 1)—is perturbed when MAP6 expression is impaired (Schwenk et al., 2014).

Overall, these results show that MAP6's association with membranous compartments plays important roles in establishing and maintaining neuronal morphology. The several endocytosis-related proteins such as Varp, dynamin 1 or endophilin 1 (Craft et al., 2008; Vikhрева et al., 2009) which have been found to interact with MAP6 (Supplementary Table 1) suggests that the roles played by MAP6 in intracellular organelle trafficking still holds many secrets.

MAP6 and Calcium Channels

Proteomic analysis of the nano-environment of calcium channels (Ca_v2.1, Ca_v2.2, Ca_v2.3, Ca_vBeta3, Ca_vBeta4) revealed the presence of MAP6 (Müller et al., 2010; Figure 1). More recently, MAP6, through its Mn3 module, was found to associate with Tctex1 (Brocard et al., 2017), a dynein light chain interacting with Ca_v2.2/N-type calcium channels (Lai et al., 2005). In conjunction with Tctex1, MAP6 is involved in sorting and trafficking Ca_v2.2 channels, as shown by impaired calcium signaling in MAP6 KO neurons (Brocard et al., 2017).

MAP6 and Neuroreceptors

Even if MTs are only transiently present in both pre- and post-synaptic compartments of synapses (axonal boutons and dendritic spines), MAP6 was consistently identified in synaptic proteomes, suggesting MT-independent roles (Peng et al., 2004; Baratier et al., 2006; Cheng et al., 2006; Collins et al., 2006; Munton et al., 2007; Weingarten et al., 2014). In a study related to subicular neurons from the hippocampus, MAP6 was associated with the receptors Neuropilin1, Plexin D1, and VEGFR2—which together make up the tripartite Semaphorin 3E receptor (Deloulme et al., 2015; Figure 1).

MAP6 Is Involved in Signaling Cascades

In addition to its associations with subcellular compartments and receptors, MAP6 protein contains proline-rich domains (PRD), which are involved in the binding of SH3-domain-containing proteins (Figure 1 and Supplementary Table 1). Binding of Intersectin 1, cSrc, PLC-γ, or PI3K have all been described (Mordèrer et al., 2012; Deloulme et al., 2015). One of the PRD domains in MAP6 is essential to the Semaphorin 3E signaling cascade (Deloulme et al., 2015), driving the formation of the fornix, an axonal tract which requires Semaphorin 3E signaling.

Although some interactions with kinases and phosphatases have been reported (Figure 1), almost nothing is known about how MAP6's functions are regulated by phosphorylation enzymes, with the exception of CaMKII. MAP6-N protein contains four CaMKII phosphorylation sites located within its calmodulin/MT-binding domains. These domains can be phosphorylated *in vitro* and *in vivo*. Phosphorylation induces MAP6 to detach from MTs and delocalize to actin within

growth cones or dendritic spines (Baratier et al., 2006; Peris et al., 2018).

Finally, MAP6 was shown to associate with the highly brain-enriched BCH (Cdc42GAP Homology)-domain-containing protein Bmcc1/Prune2 (Figure 1) which negatively regulates the actin cytoskeleton regulator RhoA (Soh and Low, 2008). This association promotes the emergence of membrane protrusions (Arama et al., 2012). However, the relationship between a direct or indirect effect on the cytoskeleton is not clear.

Physio-pathological Roles of MAP6 in the Central Nervous System

As neuronal MAPs, especially MAP6, were thought to be strong MT stabilizers, its deletion in mice was expected to be lethal due to major MT-breakdown in neurons. But in fact, MAP6 KO mice (also known as STOP KO mice) are viable, with an apparently normal brain organization (Andrieux et al., 2002). However, these mice display a wide range of biological and behavioral impairments reminiscent of symptoms displayed by patients suffering from psychiatric disorders, especially schizophrenia, as detailed below.

MAP6 KO Mice as a Model for the Study of Schizophrenia

MAP6 KO mice show hyperactivity, fragmentation of normal activity, anxiety-like behavior, social withdrawal, and impaired maternal behavior leading to the death of pups (Andrieux et al., 2002). These defects are associated with altered synapse-functioning, particularly during synaptic plasticity events when the synapses need to adapt their reactivity. These alterations lead, for example, to strong deficits in potentiation or depression of the synaptic responses. These biological and behavioral defects were shown to respond to long-term treatment with antipsychotics, the gold standard in schizophrenia treatment, thus positioning MAP6 KO mice as a useful model for the study of the physiopathology of this disease (Andrieux et al., 2002).

Schizophrenia is a chronic debilitating neurodevelopmental disorder that affects approximately 1% of the population worldwide; the first symptoms emerge during adolescence and early adulthood. It is characterized by a combination of positive (auditory and visual hallucination), negative (social withdrawal, anxiety), and cognitive symptoms (impaired memory, decision-making difficulties; Joseph et al., 2015). Following our seminal 2002 article (Andrieux et al., 2002), numerous studies were performed and their findings reinforced the validity of the MAP6 KO model for the study of schizophrenia. Indeed, MAP6 KO mice fulfill the three—construct/face/predictive—criteria for the validity of an animal model (Belzung and Lemoine, 2011; Jones et al., 2011) with similar underlying molecular defects/phenotypes/pharmacological responses, respectively (Delotterie et al., 2010; Volle et al., 2013; Deloulme et al., 2015; Bouet et al., 2021).

In further support of the validity of this model, subsequent studies revealed defects in MAP6 expression in humans presenting developmental delay, corpus callosum dysgenesis, autistic or schizophrenic symptoms (Shimizu et al., 2006;

Choi et al., 2009; Martins-de-Souza et al., 2009; Xiao et al., 2015; Coumans et al., 2016; Wei et al., 2016a,b; Chen et al., 2021).

MAP6 Roles in Neurotransmission and Impact on Behavior

In tight correlation with the hyper-dopaminergia observed in schizophrenic patients (Carlsson et al., 2000; Kapur, 2003), MAP6 KO mice present increased dopamine overflow in the mesolimbic pathway. This system plays a significant role in mediating pleasure and rewarding experiences (Brun et al., 2005; Bouvrais-Veret et al., 2007, 2008). Schizophrenia also presents positive symptoms, and MAP6 KO mice exhibited increased locomotor activity (Andrieux et al., 2002; Brun et al., 2005; Fradley et al., 2005; Bouvrais-Veret et al., 2007) associated with hypersensitivity to novelty or to the psychostimulant amphetamine (Brun et al., 2005; Bégou et al., 2007; Bouvrais-Veret et al., 2008), along with extensive disruption of sleep patterns (Profitt et al., 2016). All these processes crucially depend on dopaminergic neurotransmission.

Negative symptoms in schizophrenia are mediated by alterations in both the glutamatergic and serotonergic (5-HT) neurotransmission systems (Aghajanian and Marek, 2000; Carlsson et al., 2000). MAP6 KO mice exhibited abnormal glutamatergic neurotransmission with altered synaptic plasticity in the hippocampus, leading to totally defective Long-Term Potentiation (LTP) and Long-Term Depression (LTD), as measured by electrophysiology techniques (Andrieux et al., 2002). These defects are related to a smaller presynaptic vesicle pool (Andrieux et al., 2002), a decreased level of glutamate and the glutamate precursor glutamine in the forebrain (Brenner et al., 2007), as well as decreased mRNA levels of the glutamate transporter-1, *Vglut1* (Eastwood et al., 2007). MAP6 KO mice are thus characterized by an overall hypo-glutamatergia.

If we now focus on serotonergic neurotransmission, serotonin biosynthesis and expression of the serotonin (5-HT) receptors are highly perturbed in MAP6 KO mice, with a 70% increase in 5HT-1A expression in the raphe nuclei for example (Fournet et al., 2010), as well as half reduction of serotonin (5-HT) in the substantia nigra, the ventral tegmental area and the hippocampus (Fournet et al., 2012b). In addition, the levels of serotonin transporters (SERT) recapturing the serotonin (5-HT) released into the synaptic cleft is very severely affected in MAP6 KO mice with a decreased expression ranging from 30% to 90% in some brain areas whereas the expression increase up to 120% in other brain regions (Fournet et al., 2010). MAP6 KO mice thus display an extreme imbalance in serotonergic transmission.

Finally, sensory-motor gating is also altered in MAP6 KO mice (Fradley et al., 2005; Volle et al., 2013). This effect might be linked to perturbed dopamine-, glutamate-, and serotonin-mediated neurotransmission, but could also be related to activation of opioid mu receptors (Quednow et al., 2008) which is altered in MAP6 KO mice (Charlet et al., 2010).

In summary, basal neurotransmission for all the major neurotransmitters is strongly perturbed in MAP6 KO mice. Strikingly, serotonergic neurons—the longest and most extensively branched neurons in the brain—display very

severe morphological defects, suggesting complementary roles of MAP6 in these neurons. These roles may include MT stabilization, modulation of serotonin neuroreceptors/transporters, and involvement in signaling cascades.

MAP6 Roles in Synaptic Plasticity

In terms of cognitive symptoms, MAP6 KO mice exhibit severe defects in both short- and long-term hippocampal synaptic plasticity. Indeed, glutamatergic hippocampal neurons in the CA1 region display severely defective Post-Tetanus Potentiation (PTP), and, as indicated above, cannot support LTP and LTD (Andrieux et al., 2002). Synaptic deficits exist in the presynaptic compartment, the axonal bouton, where a two-fold decrease in synaptic vesicles is reported (Andrieux et al., 2002) with a possible glutamate-release defect due to the absence of interaction between MAP6 and the SNARE protein SNAP25 (Figure 1). One can speculate on the formation of a transient complex between MAP6 and SNAP25 at the plasma membrane, in the presynaptic release zone, as the membrane targeting of both proteins is induced by similar palmitoylating enzymes (Greaves and Chamberlain, 2011; Gory-Fauré et al., 2014). In addition, the absence of MAP6 induces a general decrease in spine density which is related to altered actin dynamics in dendritic spines (Peris et al., 2018). MAP6 could also contribute to the entry of MTs into the synaptic compartments, and their residence time, thus influencing synaptic strength. Overall, these synaptic defects are most probably a consequence of MAP6's involvement in signaling cascades, receptor homeostasis, and cytoskeleton regulation.

MAP6 Roles in Neuroanatomy

Although the first rough anatomical study of MAP6 KO mice revealed no obvious defects in brain anatomy (Andrieux et al., 2002), subsequent detailed studies showed that MAP6 KO mice have a reduced brain volume associated with an increased ventricular volume and a reduced cerebellum and thalamus size (Powell et al., 2007; Deloulme et al., 2015). Through the use of brain imaging techniques, MAP6 KO mice were found to exhibit a decrease in myelinated tract volumes (e.g., in the internal capsule and cerebellar peduncle) as well as a strong decrease in cortico-spinal tract fasciculation (Deloulme et al., 2015; Gimenez et al., 2017). A very intriguing structural defect is the absence of an important component of the limbic system in MAP6 KO mice—the post-commissural part of the fornix (Deloulme et al., 2015). The fornix is a tract that emerges from the subiculum, the most inferior component of the hippocampal formation of both hemispheres and extends to the mammillary bodies, within the hypothalamus. As part of the Papez circuit, the lack of the fornix leads to a dis-connectivity between the hippocampus and the hypothalamus and certainly contributes to the behavioral defects observed in MAP6 KO mice. During the formation of the fornix, Semaphorin 3E is an attractive guidance molecule for subicular neurons (Chauvet et al., 2007) as it binds to its tripartite receptor (Neuropilin 1/PlexinD1/VEGFR2) to induce activation of downstream signaling cascades involving SH3-containing proteins. Interestingly, the impaired fornix formation observed in MAP6 KO mice is not dependent on MAP6's MT-binding

domains; rather it is driven by the interaction of MAP6 PRD domains with key SH3-domain-containing proteins, including Intersectin 1, PI3K, and Src (Figure 1; Dédoume et al., 2015). The axonal tract defects identified in MAP6 KO mice correlate to a striking extent with anomalies identified on brain images from patients with schizophrenia (McCarley et al., 1999; De Peri et al., 2012; Shepherd et al., 2012; Bopp et al., 2017), including alteration of the fornix or of the cortico-spinal tract (Douaud et al., 2007; Kendi et al., 2008; Fitzsimmons et al., 2009; Luck et al., 2010; Davidson et al., 2012; Lee et al., 2013).

MAP6 Role in Neurogenesis

MAP6 is highly expressed in the olfactory bulb and the hippocampus (Couégnas et al., 2007; Richard et al., 2009), two regions where adult neurogenesis is known to occur. Several studies investigated adult neurogenesis in MAP6 KO mice. Benardais et al. (2010) reported an increased number of proliferating cells in the olfactory epithelium with increased apoptosis, whereas Fournet et al. (2010) discovered decreased cell proliferation in the hippocampus. At the molecular level, how MAP6 regulates neurogenesis remains a completely open question, although it is possible that MAP6 through its binding to the retinoic receptors RAR-beta and RAR-gamma (Figure 1) can modulate their functions known to be active during neurogenesis (Jacobs et al., 2006; Maden, 2007; Mishra et al., 2018).

MAP6 KO Mice Deficits and Therapeutic Approaches

As the defects observed in MAP6 KO mice are reminiscent of schizophrenia symptoms, the gold standard treatments for psychiatric diseases were the most obvious approach to try in an attempt to alleviate MAP6 KO deficiencies. Alternatively, new pharmacological approaches targeting the neuro-cytoskeleton represent promising avenues of investigation.

Classical treatments of psychiatric diseases. In accordance with their defects in almost all neuro-transmission systems, the defects observed in MAP6 KO mice are sensitive to neuroactive molecules. Thus, long-term treatments with both typical antipsychotics, such as haloperidol (Haldol) (dopamine antagonist), and atypical antipsychotics, such as risperidone (Risperdal) or clozapine (dopamine and serotonin antagonists), alleviate behavioral defects in MAP6 KO mice (Andrieux et al., 2002; Béguou et al., 2008; Dédotterie et al., 2010). Moreover, clozapine improves alterations to synaptic plasticity (Dédotterie et al., 2010) *via* its known positive effect on glutamatergic synapses (Fukuyama et al., 2019). Similarly, treatment of MAP6 KO mice with anti-depressants such as fluoxetine/Prozac (a Selective Serotonin Reuptake Inhibitor, gold standard treatment for depression) alleviated anxiety-like behavior and cognitive defects (Fournet et al., 2012a). The depressive-like behavior of MAP6 KO mice and their impaired hippocampal neurogenesis were alleviated by the use of electroconvulsive stimulation (ECS) (Jonckheere et al., 2018). ECS is the animal equivalent of Electroconvulsive Therapy (ECT), which remains a very powerful and useful treatment for major depression.

Cytoskeleton-related drugs represent a new pharmacological approach to psychiatric disorders. MAP6 KO mice were the first animal model to establish a link between cytoskeleton defects and

the cognitive impairment characteristics of psychiatric disorders, in particular schizophrenia (Andrieux et al., 2002). Subsequently, other cytoskeletal components including actin and tubulin themselves, as well as CRMP1, CRMP2, MAP2, MAP1B, and LIM kinases were also linked to psychiatric disorders (see below and for review: Benitez-King et al., 2007; Gardiner et al., 2011; Zhao et al., 2015; Marchisella et al., 2016; Lasser et al., 2018). In addition, proteins that were initially identified as risk factors for mental illnesses, such as DISC1 (Disrupted In Schizophrenia) or dysbindin, were later shown to interact with MTs, MAPs, and actin (Morris et al., 2003; Hayashi et al., 2005; Talbot et al., 2006; Taya et al., 2007; Shimizu et al., 2008; Marley and von Zastrow, 2010; Bader et al., 2012).

In this context, cytoskeleton-related drugs have been investigated to determine their ability to influence biological and behavioral defects in MAP6 KO mice. Firstly, chronic exposure of MAP6 KO mice to Epothilone D (EpoD), a modulator of MT dynamics known to stabilize MTs *in vitro* (Chou et al., 1998; Kolman, 2004), leads to behavioral changes (improved maternal behavior, and concomitant pup survival), and improves short-term memory, associated with restoration of synaptic plasticity (LTP) in the hippocampus (Andrieux et al., 2006; Fournet et al., 2012a), as well as restoring neuronal transport deficits (Daoust et al., 2014). Second, a small peptide motif called NAP—present in Activity-Dependent Neuroprotective Protein (ADNP), which is dysregulated in schizophrenia and in autism (Gozes, 2011; Hacoheh-Kleiman et al., 2018; Van Dijk et al., 2019)—partially alleviates cognitive impairments in MAP6 heterozygous mice (Merenlender-Wagner et al., 2010; Volle et al., 2013). NAP directly interacts with tubulin (Divinski et al., 2004) and also promotes MT growth and stability by its interaction with MT plus-end binding proteins of EB family (+TIPs proteins) (Gozes and Divinski, 2007; Oz et al., 2014). In addition, NAP has been shown to bind to Tau (Ivashko-Pachima et al., 2019) and to enhance its binding to MTs in cells (Ivashko-Pachima et al., 2017; Ivashko-Pachima and Gozes, 2019). Thus, NAP protective activity involves MT dynamics modulation *via* direct binding to tubulin and interaction with MT-associated proteins (Oz et al., 2014; Ivashko-Pachima et al., 2017). However, NAP's effects in MAP6 KO mice might not be exclusively related to its MT-related properties as chronic NAP treatment restores normal levels of Beclin1 mRNA in MAP6-deficient mice (Merenlender-Wagner et al., 2014). Beclin1 is a key regulator of autophagy and its expression is strongly decreased in brains from patients with schizophrenia (Merenlender-Wagner et al., 2015).

Overall, these studies with EpoD and NAP highlight MAP6-mediated MT stabilization as an important feature for synaptic plasticity and behavior. The results presented also suggest that the cytoskeleton might be a relevant target for drug development to treat psychiatric disorders including schizophrenia.

Is MAP6 Present in Cilia and Linked to Schizophrenia Phenotypes?

MAP6 was the first neuronal MIP to be identified (Cuveillier et al., 2020). MIPs were originally described in the MT doublet of motile cilia and flagella axonemes (Kirima and Oiwa, 2018;

Owa et al., 2019), where MTs needed to be highly stable to support the strong deformations required to produce a beating motion. The question of whether MAP6 also localizes to non-motile (primary) cilia or to motile cilia within the brain remains open. Future studies assessing these possibilities may provide additional molecular explanations for some of the cognitive impairments observed in MAP6 KO mice. Indeed, ciliopathies can lead to brain malformation and/or mental retardation (Reiter and Leroux, 2017). More precisely, primary cilia which act as signaling platforms participating in Sonic hedgehog or Wnt signaling pathways for example (Lee and Gleeson, 2010) have been shown to modulate neurotransmission through dopamine receptors expressed on their surface (Domire et al., 2011; Iwanaga et al., 2011; Leaf and Von Zastrow, 2015). Interestingly, Inversin and APT1—both MAP6 partners—have been shown to be part of the Wnt pathway (Supplementary Table 1). More directly, a reduced number of primary cilia was observed in the olfactory neuroepithelium in patients with schizophrenia (Muñoz-Estrada et al., 2018) and DISC1 was shown to be necessary for the formation of neuronal cilia (Marley and von Zastrow, 2010; Wang and Brandon, 2011). It would be interesting to investigate a possible role for MAP6 acting as a MIP in controlling the number and integrity of neuronal primary cilia.

CRMPs: FROM SIGNALING PATHWAYS TO CYTOSKELETON FUNCTIONS

Research on the structural MAPs revealed over time that their functions are not restricted to MT regulation. Simultaneously, other proteins that were first identified in signaling cascades, for example, were subsequently found to belong to the family of structural MAPs. Collapsin Response Mediator Proteins (CRMPs) are a perfect example of such proteins. Indeed, in addition to their well-known roles in signal transduction and neuronal physiology, we will summarize how, since the 1990s, CRMPs have been documented to play roles in regulating the cytoskeleton and especially in MT dynamics.

CRMP Proteins as Signaling Proteins

Originally discovered in *C. elegans* and named ULIP (UNC-33 like phosphoprotein), members of the CRMP family are involved in neuronal connectivity for sensory and motor neurons (Brenner, 1974; Hedgecock et al., 1985). These proteins originated from various genes and were subsequently renamed Collapsin Response Mediator Proteins (CRMPs) due to their involvement in Semaphorin 3A guidance molecule signaling (Collapsin was the original name of Semaphorin 3A; Goshima et al., 1995).

CRMPs are substrates for a large number of kinases, and high levels of phosphorylation have been reported, mostly in the C-terminal domain (Cole et al., 2004, 2006; Zheng et al., 2018); CRMP phosphorylation has been extensively studied in the context of the axonal guidance signaling pathway induced by Semaphorin 3A. Several kinases involved in this signaling pathway phosphorylate CRMPs. First, Cdk5 acts as the priming kinase, phosphorylating CRMP1, 2, 4, and 5 in response to a Semaphorin 3A-signal *in vitro* and *in vivo*

(Brown et al., 2004; Uchida et al., 2005). This phosphorylation is required for subsequent phosphorylation of CRMPs by GSK3 β , shown to be a key factor in modulating CRMPs' interaction with the cytoskeleton (Uchida et al., 2005; Yoshimura et al., 2005). Thus, the Semaphorin 3A-induced phosphorylation of CRMP2 by Cdk5 and GSK3 β blocks its capacity to bind tubulin and MTs (Uchida et al., 2005; Yoshimura et al., 2005). This lack of interaction leads to cytoskeleton breakdown and the resulting collapse of the growth cone, as the functional consequences of Semaphorin 3A signaling.

Semaphorin 3A-stimulation of the growth of dendritic spines also involves CRMP1 phosphorylation by Cdk5, blocking its interaction with actin (Yamashita et al., 2011; Yao et al., 2016).

Phosphorylation events on CRMPs, thus regulate the proteins' capacity to interact with the cytoskeleton while also modulating their interaction with other partners, such as RhoA (Alabed et al., 2007), the guidance cue co-receptor PlexinA1 (Deo et al., 2004), or the ion channels Cav2.2 (Brittain et al., 2009), and Nav1.7 (Dustrude et al., 2016).

At the same time, the C-terminal part of CRMP2 shares similarities with Tau PRD domains (Hensley and Kursula, 2016), opening up the possibility that CRMPs can bind to SH3-domain-containing proteins.

CRMPs Bind and Stabilize Microtubules

From the time of their discovery in 1985, CRMPs were linked to MTs since mutations induced an over-abundance of MTs in axonal shafts (Hedgecock et al., 1985). It was therefore proposed that CRMP could modulate axonal outgrowth by stabilizing the cytoskeleton (Hedgecock et al., 1985). More recent work has indicated that all CRMPs bind tubulin both *in vitro* and *in vivo* (Fukata et al., 2002a; Lin et al., 2011; Khazaei et al., 2014), although the interaction between CRMP2 and MTs has been the focus of this particular study. Indeed, for CRMP2, its interaction with MTs was recently found to involve two distinct domains: the N-terminal domain, which is essential for binding to soluble tubulin, thus promoting MT polymerization; and the C-terminal region, which interacts with and stabilizes polymerized microtubules (Niwa et al., 2017). Although the ability to bind MTs is shared by all CRMPs, the MT-stabilizing capacity reported for CRMP2 is only shared by CRMP1 and CRMP4 (Lin et al., 2011). In contrast, CRMP5 does not influence MT dynamics (Brot et al., 2010), and CRMP3 was shown to inhibit MT polymerization (Aylsworth et al., 2009). The role of CRMP2 in MT assembly was found to be crucial for neurite formation and axon development (Fukata et al., 2002b) whereas CRMP4-dependent MT organizations contribute to growth-cone dynamics (progression, pausing, and retraction) as well as to axon elongation and regeneration (Khazaei et al., 2014).

CRMPs Associate With Actin

Of all the isoforms, only CRMP3 presents weaker or no interaction with actin (Tan et al., 2015). All other CRMPs have an actin-binding site located at their C-terminal end, adjoining their MT-binding site. This actin-binding site was initially characterized in CRMP4 and promotes the formation of F-actin

both *in vitro* and *in vivo* (Rosslénbroich et al., 2005; Khazaei et al., 2014; Cha et al., 2016). In neurons, through their action on the actin cytoskeleton, CRMP4 and CRMP5 contribute to neurite outgrowth and growth-cone remodeling (Khazaei et al., 2014; Gong et al., 2016), and CRMP4's actin-binding capacity also contributes to dendrite maturation in hippocampal neurons (Cha et al., 2016). The effects of CRMP1 and CRMP2 on actin dynamics are more indirect, as interactions with VASP family proteins or the Sra-1 / WAVE1 complex are required for these proteins to influence axon formation and growth (Kawano et al., 2005; Yu-Kemp and Briehner, 2016; Yu-Kemp et al., 2017).

CRMPs Associate With Membranes and Neuroreceptors

The role of CRMPs in vesicular trafficking and plasma membrane targeting of several transmembrane proteins is well-documented. Thus, CRMP2 is known to bind to the vesicle-associated proteins Slp1 and Rab27 allowing anterograde transport of BDNF receptor TrkB (Arimura et al., 2009). It also binds to the endocytic adaptor Eps15, the ubiquitin ligase Nedd4.2, and to α -adaptin which regulates clathrin-dependent endocytosis of the cellular adhesion molecule L1 and the sodium channel Nav1.7 (Nishimura et al., 2003; Kawano et al., 2005; Dustrude et al., 2016). CRMP1 modulates Na⁺ currents by interacting with Nav1.7 (Yamane et al., 2017) whereas, like MAP6, CRMP2, and CRMP3 respectively interact with voltage-gated Cav2.2/N-type and L-type channels (Brittain et al., 2009; Chi et al., 2009; Quach et al., 2013). CRMP4 is involved in vesicular trafficking through mechanisms involving binding to the SH3 domains of the scaffolding protein Intersectin 1 (Quinn et al., 2003)—which is also a MAP6 partner (Figure 1).

Despite the early discovery of the involvement of CRMPs in the Semaphorin 3A signaling pathway (Goshima et al., 1995), little is known about direct interactions between CRMPs and the numerous semaphorin receptors represented by the Neuropilin and Plexin families. CRMP1, 2, 3, and 4 complexes with Plexin-A1 have been reported following over-expression of the different isoforms in the COS7 cell line (Deo et al., 2004), and associations with the mono-oxygenases MICALs have also been described (Schmidt et al., 2008). In addition, CRMP2 was shown to interact with Plexin-A2 and A3 in the Nogo and Semaphorin 3A signaling pathways, respectively (Sekine et al., 2019; Jiang et al., 2020).

Physio-pathological Roles of CRMPs in the Central Nervous System

As part of their regulation of neuronal development and plasticity, CRMPs are involved in many neurodevelopmental processes including neural progenitor proliferation (Charrier et al., 2006), neuronal migration (Yamashita et al., 2006), and neuronal morphogenesis with both axonal and dendritic maturation influences. The study of CRMP1, CRMP2, and CRMP4 KO neurons revealed morphological defects, especially in dendritic development and branching, but also in migration and positioning (Yamashita et al., 2006, 2007; Niisato et al., 2012). These phenotypes are more severe in double KO neurons, whether the combination is CRMP1 and CRMP4, or

CRMP2 and CRMP4 (Tan et al., 2015; Yamazaki et al., 2020). *In vivo*, KO of any CRMP (CRMP1, CRMP2, CRMP3, or CRMP4) leads to robust alteration of dendritic morphogenesis in several brain regions including the hippocampus and the cortex (Yamashita et al., 2007; Quach et al., 2008; Niisato et al., 2012, 2013; Yamashita and Goshima, 2012; Tsutiya et al., 2015, 2016). CRMP2 is also strongly associated with axonal specification (Nishimura et al., 2003; Kawano et al., 2005; Yoshimura et al., 2005; Morita and Sobue, 2009). The extensive effects of CRMPs on neuronal differentiation are stronger than those observed for the deletion of classical MAPs. This enhanced effect might be due to the crucial roles of CRMPs at the interface between elements of the cytoskeleton and signaling proteins. Impairment of CRMPs functions also leads to synaptic-plasticity defects with abnormal LTP (Su et al., 2007; Quach et al., 2008, 2011; Yamashita et al., 2011), linked to impaired learning and memory (Su et al., 2007; Yamashita et al., 2013).

In humans, CRMPs are associated with several psychiatric disorders, with striking numbers of publications providing evidence of links between CRMPs and schizophrenia (Nakata et al., 2003; Nakata and Ujike, 2004; Ujike et al., 2006; Koide et al., 2010; Hensley et al., 2011; Bader et al., 2012; Lee et al., 2015; Quach et al., 2015; Toyoshima et al., 2019). For example, polymorphisms in the genes encoding CRMP1 and CRMP2, as well as altered hippocampal expression of CRMP2 and CRMP4 have been reported in patients with schizophrenia (Edgar et al., 2000; Beasley et al., 2006; Föcking et al., 2011; Bader et al., 2012). In addition, the abnormal sensory-motor gating abilities reported in psychiatric patients and described for MAP6 KO mice (Fradley et al., 2005), were also replicated in CRMP1 and CRMP3 KO mice (Quach et al., 2008; Yamashita et al., 2013). Importantly, these defects could be alleviated through the use of the antipsychotic chlorpromazine (Yamashita et al., 2013), and CRMP2 and CRMP4 phosphorylation states were shown to be downregulated by the antipsychotics Clozapine and Risperidone (Kedracka-Krok et al., 2015).

Which Proteins Can Be Classified as MAPs?

In summary, the ability of CRMPs to bind MTs, and thus promote their polymerization and stabilization, are major arguments to consider them as members of the wider MAP family. Moreover, and as indicated above, like other MAPs, CRMPs can also bind actin and are involved in signaling cascades. As for conventional MAPs, deletion of CRMPs in mice does not lead to severe cytoskeleton alterations, but rather to subtler neurodevelopmental defects and cognitive dysfunctions similar to those encountered in psychiatric diseases. The history of protein identification draws attention toward specific research. In the case of CRMPs, although data regarding their interactions with MTs have been produced they have not been extensively investigated in the field of cytoskeleton research. In particular, they have never been used in *in vitro* cell-free systems. Several basic questions thus remain open, such as: Do CRMPs modulate specific parameters of

microtubule dynamics? Do they induce MT bundling or simply MT polymerization?

Our demonstration that CRMPs can be considered as MAPs could be extended to other proteins like for example, the Huntingtin protein or α -synuclein. These two proteins have been actively studied in the context of neurodegenerative diseases. Indeed, HTT binds to MTs and actin, is involved in signaling cascades, is palmitoylated by the same DHCC as MAP6 (Lemonidis et al., 2015), and interacts with neuroreceptors (for review see Saudou and Humbert, 2016). Similarly, α -synuclein, a MAP6 partner (Figure 1), interacts with and nucleates MTs (Cartelli et al., 2016). α -synuclein also interacts with actin and reduces F-actin polymerization speed (Sousa et al., 2009; Cartelli et al., 2016; Oliveira da Silva and Liz, 2020). It also participates in signaling cascades and neuroreceptor functions (for review see Emamzadeh, 2016; Bernal-Conde et al., 2019). In addition to these examples, proteins related to schizophrenia susceptibility could be mentioned, such as DISC1 (Disrupted In Schizophrenia) or dysbindin, both of which have been shown to interact with MTs, MAPs, and actin (Morris et al., 2003; Hayashi et al., 2005; Talbot et al., 2006; Taya et al., 2007; Shimizu et al., 2008; Marley and von Zastrow, 2010; Bader et al., 2012).

COMMON PROPERTIES OF THE NEURONAL STRUCTURAL MAPS

In this section, we will briefly summarize the properties of the classical neuronal structural MAPs (Tau, MAP1, and MAP2) and compare them to those described for MAP6 and CRMPs. We will focus particularly on properties that are just coming to light.

All the classical MAPs bind to MTs and induce various levels of stability (Baas et al., 1994; Bulinski and Bossler, 1994; Vandecandelaere et al., 1996; Faller et al., 2009; Kadavath et al., 2015; Qiang et al., 2018). Recent advances in cryo-EM have made it possible to visualize how Tau binds along protofilaments at the interface between tubulin dimers (Kellogg et al., 2018). Elucidating the near-atomic structure of complexes between the other MAPs and MTs is essential if we wish to reveal the common and specific mechanisms behind MT stabilization for each MAP. Interestingly, several classical MAPs such as MAP1B, MAP2, and Tau, are also able to indirectly modulate MT dynamics *via* their interaction with EB proteins (Kapitein et al., 2011; Tortosa et al., 2013; Sayas et al., 2015; Ramirez-Rios et al., 2016). Such a possibility regarding MAP6 and CRMPs has not yet been investigated and could be of interest.

With regard to the ability of MAP6 to behave as a MIP, future studies will reveal whether this property is shared by other structural MAPs. Although some previous works suggested that Tau binds to the luminal side of MTs (Kar et al., 2003; Inaba et al., 2019), the answer to this question remains elusive. Interestingly, actin was very recently discovered inside the MT lumen (Paul et al., 2020), opening the possibility that MAPs/MIPs might be involved in the crosstalk between

the two cytoskeletons in the MT lumen like they are in the cytoplasm.

Like MAP6, the other structural MAPs—Tau, MAP1, and MAP2—were shown to bind actin (Griffith and Pollard, 1982; Pedrotti et al., 1994; Ozer and Halpain, 2000; Roger et al., 2004; Ding et al., 2006) and to regulate synaptic plasticity through actin-dependent mechanisms (Davidkova and Carroll, 2007; Tortosa et al., 2011; Benoist et al., 2013; Takei et al., 2015). Interestingly, Tau was directly shown to co-organize actin and MT networks *in vitro* and in the neuronal growth cone (Elie et al., 2015; Biswas and Kalil, 2018), this ability may be shared by the other MAPs (Mohan and John, 2015).

In relation to neuroreceptors, like MAP6 (Figure 1), MAP1 and MAP2 proteins interact with the Cav2.2/N-type calcium channel or with BKCa potassium channels (Davare et al., 1999; Park et al., 2004; Leenders et al., 2008). In terms of membrane-association, Tau and MAP2 interact with the membranes of the Golgi and the endoplasmic reticulum (Farah et al., 2005, 2006), whereas MAP1B was shown to link mitochondria and autophagosomes to MTs (Xie et al., 2011).

Several other MAPs in addition to MAP6 contain PRD domains and thus interact with SH3-containing proteins. For example, Tau and MAP2 bind to various SH3-containing proteins including the non-receptor tyrosine kinase Src (MAP6 partner, Figure 1; Lim and Halpain, 2000). Interestingly, in link with Alzheimer's disease, a general inhibition of Tau's interactions with SH3-domain-containing proteins was shown to reduce Amyloid β -induced membrane trafficking abnormalities and neurite degeneration (Rush et al., 2020).

Finally, as with MAP6 deletion, inactivation of other MAPs in mice did not result in major MT-breakdown or in lethal neurodevelopmental defects but rather produced viable mice (Harada et al., 1994; Takei et al., 1997, 2015; Teng et al., 2001). However, all KO mice display cognitive dysfunctions similar to those associated with psychiatric diseases. Thus, Tau KO mice exhibit impaired neurogenesis (Dioli et al., 2017), hippocampal synaptic plasticity, and cognitive defects (Ikegami et al., 2000; Lei et al., 2012; Ahmed et al., 2014; Ma et al., 2014; Regan et al., 2015), as well as age-dependent brain atrophy associated with loss of neurons and synapses (Lei et al., 2012). MAP1B-deficient mice also display abnormal synapse maturation (Tortosa et al., 2011; Bodaleo et al., 2016), along with synaptic transmission defects due to deregulation of AMPA receptor trafficking (Benoist et al., 2013; Palenzuela et al., 2017), and impaired synaptic plasticity with abnormal LTP (Zervas et al., 2005). Importantly, MAP1B has been linked to the protein KIRREL3 which is associated with autism/intellectual disability (Liu et al., 2015). This protein is associated with the altered working memory observed in young people with attention-deficit/hyperactivity disorder (Salatino-Oliveira et al., 2016). Mutated forms of MAP1B have been linked to intellectual disability and extensive white-matter deficits in humans (Walters et al., 2018).

A review of the literature relating to MAPs, in particular, Tau (which is by far the most extensively studied MAP), reveals that some MAP features have not yet been reported

for MAP6 and CRMPs. Firstly, it is quite clear that Tau is a *bona fide* nuclear protein (for review see Bukar Maina et al., 2016) mainly contributing to defending the genome against cellular stress. As shown in Supplementary Table 1, MAP6 has been shown to interact with various nuclear receptors and effectors, but nothing is known about its possible roles in the nucleus. Secondly, Tau is an unstructured protein that has been shown to promote phase-separation events in cells, both as part of physiological processes such as axonal transport and in pathological conditions such as during Tau aggregation (Hernández-Vega et al., 2017; Wegmann et al., 2018; Siahaan et al., 2019). How the capacity of Tau to promote phase separation affects its non-cytoskeleton-related functions still remains to be determined. As most MAPs including MAP6 are unstructured proteins, it appears logical that the ability to contribute to phase separation events will be shared by many MAPs.

CONCLUSION

Structural MAPs, presented here through the examples of MAP6 and CRMPs, are highly versatile proteins with multiple partners and functions, playing major roles in several brain functions.

The original classification of MAPs was based on their ability to bind MTs. This binding may contribute to MT stability, but it might also be crucial to ensure MAPs presence all over the cell in order to be available to promote signal propagation and/or

to form multi-protein complexes (post-synaptic densities) or regulate the protein composition of membrane compartments. In other words, the MT-binding ability of MAPs is probably required for all their other functions as it is essential to ensure specific spatial and temporal localization. These dual abilities of MAPs to stabilize MTs and to use them as a means to gain access to all regions of the cell for other functions makes it experimentally impossible to distinguish between their MT-related and -unrelated functions.

AUTHOR CONTRIBUTIONS

CC, BB, CR, ED, J-CD, SG-F, CD, CB, IA and AA wrote the manuscript. All authors contributed to the article and approved the submitted version.

FUNDING

This work was supported by funding from INSERM, CEA, CNRS, University Grenoble Alpes and in part by awards from the French Agence Nationale de la Recherche to AA and IA (2017-CE11-0026, MAMAs).

SUPPLEMENTARY MATERIAL

The Supplementary Material for this article can be found online at: <https://www.frontiersin.org/articles/10.3389/fnmol.2021.665693/full#supplementary-material>.

REFERENCES

- Aghajanian, G. K., and Marek, G. J. (2000). Serotonin model of schizophrenia: emerging role of glutamate mechanisms. *Brain Res. Brain Res. Rev.* 31, 302–312. doi: 10.1016/S0165-0173(99)00046-6
- Aguezoul, M., Andrieux, A., and Denarier, E. (2003). Overlap of promoter and coding sequences in the mouse STOP gene (Mtap6). *Genomics* 81, 623–627. doi: 10.1016/S0888-7543(03)00053-3
- Ahmed, T., Van der Jeugd, A., Blum, D., Galas, M. C., D'Hooge, R., Buee, L., et al. (2014). Cognition and hippocampal synaptic plasticity in mice with a homozygous tau deletion. *Neurobiol. Aging* 35, 2474–2478. doi: 10.1016/j.neurobiolaging.2014.05.005
- Alabed, Y. Z., Pool, M., Tone, S. O., and Fournier, A. E. (2007). Identification of CRMP4 as a convergent regulator of axon outgrowth inhibition. *J. Neurosci.* 27, 1702–1711. doi: 10.1523/JNEUROSCI.5055-06.2007
- Andrieux, A., Salin, P., Schweitzer, A., Begou, M., Pachoud, B., Brun, P., et al. (2006). Microtubule stabilizer ameliorates synaptic function and behavior in a mouse model for schizophrenia. *Biol. Psychiatry* 60, 1224–1230. doi: 10.1016/j.biopsych.2006.03.048
- Andrieux, A., Salin, P. A., Vernet, M., Kujala, P., Baratier, J., Gory-Faure, S., et al. (2002). The suppression of brain cold-stable microtubules in mice induces synaptic defects associated with neuroleptic-sensitive behavioral disorders. *Genes Dev.* 16, 2350–2364. doi: 10.1101/gad.223302
- Arama, J., Boulay, A. C., Bosc, C., Delphin, C., Loew, D., Rostaing, P., et al. (2012). Bmcc1s, a novel brain-isoform of Bmcc1, affects cell morphology by regulating MAP6/STOP functions. *PLoS One* 7:e35488. doi: 10.1371/journal.pone.0035488
- Arimura, N., Kimura, T., Nakamura, S., Taya, S., Funahashi, Y., Hattori, A., et al. (2009). Anterograde transport of TrkB in axons is mediated by direct interaction with Slp1 and Rab27. *Dev. Cell* 16, 675–686. doi: 10.1016/j.devcel.2009.03.005
- Atherton, J., Stouffer, M., Francis, F., and Moores, C. A. (2018). Microtubule architecture *in vitro* and in cells revealed by cryo-electron tomography. *Acta Crystallogr. D Struct. Biol.* 74, 572–584. doi: 10.1107/S205979831801948
- Aylsworth, A., Jiang, S. X., Desbois, A., and Hou, S. T. (2009). Characterization of the role of full-length CRMP3 and its calpain-cleaved product in inhibiting microtubule polymerization and neurite outgrowth. *Exp. Cell Res.* 315, 2856–2868. doi: 10.1016/j.yexcr.2009.06.014
- Baas, P. W., and Black, M. M. (1990). Individual microtubules in the axon consist of domains that differ in both composition and stability. *J. Cell Biol.* 111, 495–509. doi: 10.1083/jcb.111.2.495
- Baas, P. W., Pienkowski, T. P., Cimbalko, K. A., Toyama, K., Bakalis, S., Ahmad, F. J., et al. (1994). Tau confers drug stability but not cold stability to microtubules in living cells. *J. Cell Sci.* 107, 135–143.
- Baas, P. W., Rao, A. N., Matamoros, A. J., and Leo, L. (2016). Stability properties of neuronal microtubules. *Cytoskeleton (Hoboken)* 73, 442–460. doi: 10.1002/cm.21286
- Bader, V., Tomppo, L., Trossbach, S. V., Bradshaw, N. J., Prikulis, I., Leliveld, S. R., et al. (2012). Proteomic, genomic and translational approaches identify CRMP1 for a role in schizophrenia and its underlying traits. *Hum. Mol. Genet.* 21, 4406–4418. doi: 10.1093/hmg/dd273
- Baratier, J., Peris, L., Brocard, J., Gory-Faure, S., Dufour, F., Bosc, C., et al. (2006). Phosphorylation of microtubule-associated protein STOP by calmodulin kinase II. *J. Biol. Chem.* 281, 19561–19569. doi: 10.1074/jbc.M509602200
- Beasley, C. L., Pennington, K., Behan, A., Wait, R., Dunn, M. J., and Cotter, D. (2006). Proteomic analysis of the anterior cingulate cortex in the major psychiatric disorders: evidence for disease-associated changes. *Proteomics* 6, 3414–3425. doi: 10.1002/pmic.200500069
- Bégou, M., Brun, P., Bertrand, J. B., Job, D., Schweitzer, A., D'Amato, T., et al. (2007). Post-pubertal emergence of alterations in locomotor

- activity in stop null mice. *Synapse* 61, 689–697. doi: 10.1002/syn.20409
- Bégou, M., Volle, J.-B., Bertrand, J. B., Brun, P., Job, D., Schweitzer, A., et al. (2008). The stop null mice model for schizophrenia displays [corrected] cognitive and social deficits partly alleviated by neuroleptics. *Neuroscience* 157, 29–39. doi: 10.1016/j.neuroscience.2008.07.080
- Belzung, C., and Lemoine, M. (2011). Criteria of validity for animal models of psychiatric disorders: focus on anxiety disorders and depression. *Biol Mood Anxiety Disord.* 1:9. doi: 10.1186/2045-5380-1-9
- Benardais, K., Kasem, B., Couegnas, A., Samama, B., Fernandez, S., Schaeffer, C., et al. (2010). Loss of STOP protein impairs peripheral olfactory neurogenesis. *PLoS One* 5:e12753. doi: 10.1371/journal.pone.0012753
- Benitez-King, G., Ramirez-Rodriguez, G., and Ortiz-López, L. (2007). Altered microtubule associated proteins in schizophrenia. *Neuroquantology* 5:1. doi: 10.14704/nq.2007.5.1.117
- Benoist, M., Palenzuela, R., Rozas, C., Rojas, P., Tortosa, E., Morales, B., et al. (2013). MAP1B-dependent Rac activation is required for AMPA receptor endocytosis during long-term depression. *EMBO J.* 32, 2287–2299. doi: 10.1038/emboj.2013.166
- Bernal-Gonde, L. D., Ramos-Acevedo, R., Reyes-Hernandez, M. A., Balbuena-Olvera, A. J., Morales-Moreno, I. D., Arguero-Sanchez, R., et al. (2019). α -synuclein physiology and pathology: a perspective on cellular structures and organelles. *Front. Neurosci.* 13:1399. doi: 10.3389/fnins.2019.01399
- Biswas, S., and Kalil, K. (2018). The microtubule-associated protein tau mediates the organization of microtubules and their dynamic exploration of actin-rich lamellipodia and filopodia of cortical growth cones. *J. Neurosci.* 38, 291–307. doi: 10.1523/JNEUROSCI.2281-17.2017
- Bodakuntla, S., Jijumon, A. S., Villablanca, C., Gonzalez-Billault, C., and Janke, C. (2019). Microtubule-associated proteins: structuring the cytoskeleton. *Trends Cell Biol.* 29, 804–819. doi: 10.1016/j.tcb.2019.07.004
- Bodako, F. J., Montenegro-Venegas, C., Henriquez, D. R., Court, F. A., and Gonzalez-Billault, C. (2016). Microtubule-associated protein 1B (MAP1B)-deficient neurons show structural presynaptic deficiencies *in vitro* and altered presynaptic physiology. *Sci. Rep.* 6:30069. doi: 10.1038/srep30069
- Bopp, M. H. A., Zöllner, R., Jansen, A., Dietsche, B., Krug, A., and Kircher, T. T. J. (2017). White matter integrity and symptom dimensions of schizophrenia: a diffusion tensor imaging study. *Schizophr. Res.* 184, 59–68. doi: 10.1016/j.schres.2016.11.045
- Bosc, C., Andrieux, A., and Job, D. (2003). STOP proteins. *Biochemistry* 42, 12125–12132. doi: 10.1021/bi0352163
- Bosc, C., Cronk, J. D., Pirdlet, F., Watterson, D. M., Haied, J., Job, D., et al. (1996). Cloning, expression and properties of the microtubule-stabilizing protein STOP. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 93, 2125–2130. doi: 10.1073/pnas.93.5.2125
- Bosc, C., Frank, R., Denarier, E., Ronjat, M., Schweitzer, A., Wehland, J., et al. (2001). Identification of novel bifunctional calmodulin-binding and microtubule-stabilizing motifs in STOP proteins. *J. Biol. Chem.* 276, 30904–30913. doi: 10.1074/jbc.M011614200
- Bouet, V., Perceley, S., Leroux, E., Diarra, B., Leger, M., Delcroix, N., et al. (2021). A new 3-hit mouse model of schizophrenia built on genetic, early and late factors. *Schizophr. Res.* 228, 519–528. doi: 10.1016/j.schres.2020.11.043
- Boulan, B., Beghin, A., Ravanello, C., Deloulme, J. C., Gory-Faure, S., Andrieux, A., et al. (2020). AutoNeuriteJ: an ImageJ plugin for measurement and classification of neuritic extensions. *PLoS One* 15:e0234529. doi: 10.1371/journal.pone.0234529
- Bouvier, D., Vanhaverbeke, C., Simorre, J. P., Arlaud, G. J., Bally, L., Forge, V., et al. (2003). Unusual Ca^{2+} -calmodulin binding interactions of the microtubule-associated protein F-STOP. *Biochemistry* 42, 11484–11493. doi: 10.1021/bi034746w
- Bouvrais-Veret, C., Weiss, S., Andrieux, A., Schweitzer, A., McIntosh, J. M., Job, D., et al. (2007). Sustained increase of $\alpha 7$ nicotinic receptors and choline-induced improvement of learning deficit in STOP knock-out mice. *Neuropharmacology* 52, 1691–1700. doi: 10.1016/j.neuropharm.2007.03.015
- Bouvrais-Veret, C., Weiss, S., Hanoune, N., Andrieux, A., Schweitzer, A., Job, D., et al. (2008). Microtubule-associated STOP protein deletion triggers restricted changes in dopaminergic neurotransmission. *J. Neurochem.* 104, 745–756. doi: 10.1111/j.1471-4159.2007.05025.x
- Brady, S. T., Tytell, M., and Lasek, R. J. (1984). Axonal tubulin and axonal microtubules: biochemical evidence for cold stability. *J. Cell Biol.* 99, 1716–1724. doi: 10.1083/jcb.99.5.1716
- Brenner, S. (1974). The genetics of *Caenorhabditis elegans*. *Genetics* 77, 71–94. doi: 10.1093/genetics/77.1.71
- Brenner, E., Sonnewald, U., Schweitzer, A., Andrieux, A., and Nehlig, A. (2007). Hypoglutamatergic activity in the STOP knockout mouse: a potential model for chronic untreated schizophrenia. *J. Neurosci. Res.* 85, 3487–3493. doi: 10.1002/jnr.21200
- Brinkley, B. R., and Cartwright, J. Jr. (1975). Cold-labile and cold-stable microtubules in the mitotic spindle of mammalian cells. *Ann. N Y Acad. Sci.* 253, 428–439. doi: 10.1111/j.1749-6632.1975.tb19218.x
- Brittain, J. M., Piekarz, A. D., Wang, Y., Kondo, T., Cummins, T. R., and Khanna, R. (2009). An atypical role for collapsin response mediator protein 2 (CRMP-2) in neurotransmitter release via interaction with presynaptic voltage-gated calcium channels. *J. Biol. Chem.* 284, 31375–31390. doi: 10.1074/jbc.M109.009951
- Brocard, J., Dufour, F., Gory-Fauré, S., Arnoult, C., Bosc, C., Denarier, E., et al. (2017). MAP6 interacts with Tctex1 and $Ca_v2.2$ /N-type calcium channels to regulate calcium signalling in neurons. *Eur. J. Neurosci.* 46, 2754–2767. doi: 10.1111/ejn.13766
- Brot, S., Rogemond, V., Perrot, V., Chounlamountri, N., Auger, C., Honnorat, J., et al. (2010). CRMP5 interacts with tubulin to inhibit neurite outgrowth, thereby modulating the function of CRMP2. *J. Neurosci.* 30, 10639–10654. doi: 10.1523/JNEUROSCI.0059-10.2010
- Brown, M., Jacobs, T., Eickholt, B., Ferrari, G., Teo, M., Monfries, C., et al. (2004). $\alpha 2$ -chimaerin, cyclin-dependent kinase 5/p35 and its target collapsin response mediator protein-2 are essential components in semaphorin 3A-induced growth-cone collapse. *J. Neurosci.* 24, 8994–9004. doi: 10.1523/JNEUROSCI.3184-04.2004
- Brun, P., Begou, M., Andrieux, A., Mouly-Badina, L., Clerget, M., Schweitzer, A., et al. (2005). Dopaminergic transmission in STOP null mice. *J. Neurochem.* 94, 63–73. doi: 10.1111/j.1471-4159.2005.03166.x
- Bukar Maina, M., Al-Hikily, Y. K., and Serepelli, L. C. (2016). Nuclear tau and its potential role in Alzheimer's disease. *Biomolecules* 6:9. doi: 10.3390/biom6101009
- Bulinski, J. C., and Bössler, A. (1994). Purification and characterization of ensconsin, a novel microtubule stabilizing protein. *J. Cell Sci.* 107, 2839–2849.
- Burton, P. R. (1984). Luminal material in microtubules of frog olfactory axons: structure and distribution. *J. Cell Biol.* 99, 520–528. doi: 10.1083/jcb.99.2.520
- Capala, M. E., Maat, H., Bonardi, F., van den Boom, V., Kuipers, J., Vellenga, E., et al. (2015). Mitochondrial dysfunction in human leukemic stem/progenitor cells upon loss of RAC2. *PLoS One* 10:e0128585. doi: 10.1371/journal.pone.0128585
- Carlsson, A., Waters, N., Waters, S., and Carlsson, M. L. (2000). Network interactions in schizophrenia—therapeutic implications. *Brain Res. Brain Res. Rev.* 31, 342–349. doi: 10.1016/s0165-0173(99)00050-8
- Cartelli, D., Aliverti, A., Barbiroli, A., Santambrogio, C., Ragg, E. M., Casagrande, F. V., et al. (2016). α -synuclein is a novel microtubule dynamase. *Sci. Rep.* 6:33289. doi: 10.1038/srep33289
- Cha, C., Zhang, J., Ji, Z., Tan, M., Li, S., Wu, F., et al. (2016). CRMP4 regulates dendritic growth and maturation via the interaction with actin cytoskeleton in cultured hippocampal neurons. *Brain Res. Bull.* 124, 286–294. doi: 10.1016/j.brainresbull.2016.06.008
- Chapin, S. J., and Bulinski, J. C. (1994). Cellular microtubules heterogeneous in their content of microtubule-associated protein 4 (MAP4). *Cell Motil. Cytoskeleton.* 27, 133–149. doi: 10.1002/cm.970270205
- Charlet, A., Muller, A. H., Laux, A., Kemmel, V., Schweitzer, A., Deloulme, J. C., et al. (2010). Abnormal nociception and opiate sensitivity of STOP null mice exhibiting elevated levels of the endogenous alkaloid morphine. *Mol. Pain* 6:96. doi: 10.1186/1744-8069-6-96
- Charrier, C., Coronas, V., Fombonne, J., Roger, M., Jean, A., Krantic, S., et al. (2006). Characterization of neural stem cells in the dorsal vagal complex of adult rat by *in vivo* proliferation labeling and *in vitro* neurosphere assay. *Neuroscience* 138, 5–16. doi: 10.1016/j.neuroscience.2005.10.046
- Chauvet, S., Cohen, S., Yoshida, Y., Felkrane, L., Livet, J., Gayet, O., et al. (2007). Gating of *Sema3E*/PlexinD1 signaling by neuropilin-1 switches axonal

- repulsion to attraction during brain development. *Neuron* 56, 807–822. doi: 10.1016/j.neuron.2007.10.019
- Chen, C. P., Lin, S. P., Chern, S. R., Wu, P. S., Chen, S. W., Wu, F. T., et al. (2021). Tetrasomy of 11q13.4–q14.3 due to an intrachromosomal triplication associated with paternal uniparental isodisomy for 11q14.3–qter, intrauterine growth restriction, developmental delay, corpus callosum dysgenesis, microcephaly, congenital heart defects and facial dysmorphism. *Taiwan J. Obstet. Gynecol.* 60, 169–172. doi: 10.1016/j.tjog.2020.11.027
- Cheng, D., Hoogenraad, C. C., Rush, J., Ramm, E., Schlager, M. A., Duong, D. M., et al. (2006). Relative and absolute quantification of postsynaptic density proteome isolated from rat forebrain and cerebellum. *Mol. Cell. Proteomics* 5, 1158–1170. doi: 10.1074/mcp.D500009-MCP200
- Chi, X. X., Schmutzler, B. S., Brittain, J. M., Wang, Y., Hingtgen, C. M., Nicod, G. D., et al. (2009). Regulation of N-type voltage-gated calcium channels (Cav2.2) and transmitter release by collapsin response mediator protein-2 (CRMP-2) in sensory neurons. *J. Cell Sci.* 122, 4351–4362. doi: 10.1242/jcs.053280
- Choi, K. H., Zepp, M. E., Higgs, B. W., Weickert, C. S., and Webster, M. J. (2009). Expression profiles of schizophrenia susceptibility genes during human prefrontal cortical development. *J. Psychiatry Neurosci.* 34, 450–458.
- Chou, T. C., Zhang, X. G., Balog, A., Su, D. S., Meng, D., Savin, K., et al. (1998). Desoxyepothilone B: an efficacious microtubule-targeted antitumor agent with a promising *in vivo* profile relative to epothilone B. *Proc. Natl. Acad. Sci. U S A* 95, 9642–9647. doi: 10.1073/pnas.95.16.9642
- Cleveland, D. W., Hwo, S. Y., and Kirschner, M. W. (1977). Purification of tau, a microtubule-associated protein that induces assembly of microtubules from purified tubulin. *J. Mol. Biol.* 116, 207–225. doi: 10.1016/0022-2836(77)90213-3
- Cole, A. R., Cauveret, F., Yadirgi, G., Hastie, C. J., McLauchlan, H., McManus, E. J., et al. (2006). Distinct priming kinases contribute to differential regulation of collapsin response mediator proteins by glycogen synthase kinase-3 *in vivo**. *J. Biol. Chem.* 281, 16591–16598. doi: 10.1074/jbc.M513344200
- Cole, A. R., Knebel, A., Morrice, N. A., Robertson, L. A., Irving, A. J., Connolly, C. N., et al. (2004). GSK-3 phosphorylation of the Alzheimer epitope within collapsin response mediator proteins regulates axon elongation in primary neurons. *J. Biol. Chem.* 279, 50176–50180. doi: 10.1074/jbc.C400412200
- Collins, M. O., Husi, H., Yu, L., Brandon, J. M., Anderson, C. N., Blakstock, W. P., et al. (2006). Molecular characterization and comparison of the components and multiprotein complexes in the postsynaptic proteome. *J. Neurochem.* 97, 16–23. doi: 10.1111/j.1471-4159.2005.03507.x
- Couégnas, A., Schweitzer, A., Andrieux, A., Ghandour, M. S., and Boehm, N. (2007). Expression pattern of STOPlacZ reporter gene in adult and developing mouse brain. *J. Neurosci. Res.* 85, 1515–1527. doi: 10.1002/jnr.21278
- Coumans, J. V., Palanisamy, S. K., McFarlane, J., and Moens, P. D. (2016). Proteomic and microscopic strategies towards the analysis of the cytoskeletal networks in major neuropsychiatric disorders. *Int. J. Mol. Sci.* 17:581. doi: 10.3390/ijms17040581
- Craft, G. E., Graham, M. E., Bache, N., Larsen, M. R., and Robinson, P. J. (2008). The *in vivo* phosphorylation sites in multiple isoforms of amphiphysin I from rat brain nerve terminals. *Mol. Cell Proteomics* 7, 1146–1161. doi: 10.1074/mcp.M700351-MCP200
- Cuveillier, C., Delaroché, J., Seggio, M., Gory-Faure, S., Bosc, C., Denarier, E., et al. (2020). MAP6 is an intraluminal protein that induces neuronal microtubules to coil. *Sci. Adv.* 6:eaz4344. doi: 10.1126/sciadv.aaz4344
- Dacheux, D., Landrein, N., Thonnus, M., Gilbert, G., Sahin, A., Wodrich, H., et al. (2012). A MAP6-related protein is present in protozoa and is involved in flagellum motility. *PLoS One* 7:e31344. doi: 10.1371/journal.pone.0031344
- Dacheux, D., Roger, B., Bosc, C., Landrein, N., Roche, E., Chansel, L., et al. (2015). Human FAM154A (SAXO1) is a microtubule-stabilizing protein specific to cilia and related structures. *J. Cell Sci.* 128, 1294–1307. doi: 10.1242/jcs.155143
- Daoust, A., Bohic, S., Saoudi, Y., Debacker, C., Gory-Faure, S., Andrieux, A., et al. (2014). Neuronal transport defects of the MAP6 KO mouse—a model of schizophrenia—and alleviation by Epothilone D treatment, as observed using MEMRI. *NeuroImage* 96, 133–142. doi: 10.1016/j.neuroimage.2014.03.071
- Davare, M. A., Dong, F., Rubin, C. S., and Hell, J. W. (1999). The A-kinase anchor protein MAP2B and cAMP-dependent protein kinase are associated with class C L-type calcium channels in neurons. *J. Biol. Chem.* 274, 30280–30287. doi: 10.1074/jbc.274.42.30280
- Davidkova, G., and Carroll, R. C. (2007). Characterization of the role of microtubule-associated protein 1B in metabotropic glutamate receptor-mediated endocytosis of AMPA receptors in hippocampus. *J. Neurosci.* 27, 13273–13278. doi: 10.1523/JNEUROSCI.3334-07.2007
- Davidson, C. A., Kuroki, N., Alvarado, J. L., Niznikiewicz, M. A., McCarley, R. W., and Levitt, J. J. (2012). An MRI study of septi pellucidi in relation to hippocampus volume and fornix integrity in schizophrenia. *Schizophr. Res.* 134, 165–170. doi: 10.1016/j.schres.2011.11.012
- De Peri, L., Crescini, A., Deste, G., Fusar-Poli, P., Sacchetti, E., and Vita, A. (2012). Brain structural abnormalities at the onset of schizophrenia and bipolar disorder: a meta-analysis of controlled magnetic resonance imaging studies. *Curr. Pharm. Des.* 18, 486–494. doi: 10.2174/138161212799316253
- Dehmelt, L., and Halpain, S. (2005). The MAP2/Tau family of microtubule-associated proteins. *Genome Biol.* 6:204. doi: 10.1186/gb-2004-6-1-204
- Deotterre, D., Ruiz, G., Brocard, J., Schweitzer, A., Roucard, C., Roche, Y., et al. (2010). Chronic administration of atypical antipsychotics improves behavioral and synaptic defects of STOP null mice. *Psychopharmacology* 208, 131–141. doi: 10.1007/s00213-009-1712-3
- Deloulme, J.-C., Gory-Fauré, S., Mauconduit, F., Chauvet, S., Jonckheere, J., Boulan, B., et al. (2015). Microtubule-associated protein 6 mediates neuronal connectivity through Semaphorin 3E-dependent signalling for axonal growth. *Nat. Commun.* 6:7246. doi: 10.1038/ncomms8246
- Delphin, C., Bouvier, D., Seggio, M., Gouriol, E., Saoudi, Y., Denarier, E., et al. (2012). MAP6-F is a temperature sensor that directly binds to and protects microtubules from cold-induced depolymerization. *J. Biol. Chem.* 287, 35127–35138. doi: 10.1074/jbc.M112.398339
- Denarier, E., Aguezoul, M., Jolly, C., Vourc'h, C., Roure, A., Andrieux, A., et al. (1998a). Genomic structure and chromosomal mapping of the mouse STOP gene (Mtap6). *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 243, 791–796. doi: 10.1006/bbrc.1998.8179
- Denarier, E., Fourest-Lieuvin, A., Bosc, C., Pirolet, F., Chapel, A., Margolis, R. L., et al. (1998b). Nonneuronal isoforms of STOP protein are responsible for microtubule cold stability in mammalian fibroblasts. *Proc. Natl. Acad. Sci. U S A* 95, 6055–6060. doi: 10.1073/pnas.95.11.6055
- Dent, E. W., and Baas, P. W. (2014). Microtubules in neurons as information carriers. *J. Neurochem.* 129, 235–239. doi: 10.1111/jnc.12621
- Deo, R. C., Schmidt, E. F., Elhabazi, A., Togashi, H., Burley, S. K., and Strittmatter, S. M. (2004). Structural bases for CRMP function in plexin-dependent semaphorin3A signaling. *EMBO J.* 23, 9–22. doi: 10.1038/sj.emboj.7600021
- Ding, J., Valle, A., Allen, E., Wang, W., Nardine, T., Zhang, Y., et al. (2006). Microtubule-associated protein 8 contains two microtubule binding sites. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 339, 172–179. doi: 10.1016/j.bbrc.2005.10.199
- Dioli, C., Patrício, P., Trindade, R., Pinto, L. G., Silva, J. M., Morais, M., et al. (2017). Tau-dependent suppression of adult neurogenesis in the stressed hippocampus. *Mol. Psychiatry* 22, 1110–1118. doi: 10.1038/mp.2017.103
- Divinski, I., Mittelman, L., and Gozes, I. (2004). A femtomolar acting octapeptide interacts with tubulin and protects astrocytes against zinc intoxication. *J. Biol. Chem.* 279, 28531–28538. doi: 10.1074/jbc.M403197200
- Domire, J. S., Green, J. A., Lee, K. G., Johnson, A. D., Askwith, C. C., and Mykytyn, K. (2011). Dopamine receptor 1 localizes to neuronal cilia in a dynamic process that requires the Bardet-Biedl syndrome proteins. *Cell. Mol. Life Sci.* 68, 2951–2960. doi: 10.1007/s00018-010-0603-4
- Douaud, G., Smith, S., Jenkinson, M., Behrens, T., Johansen-Berg, H., Vickers, J., et al. (2007). Anatomically related grey and white matter abnormalities in adolescent-onset schizophrenia. *Brain* 130, 2375–2386. doi: 10.1093/brain/awm184
- Dustrude, E. T., Moutal, A., Yang, X., Wang, Y., Khanna, M., and Khanna, R. (2016). Hierarchical CRMP2 posttranslational modifications control Nav1.7 function. *Proc. Natl. Acad. Sci. U S A* 113, E8443–E8452. doi: 10.1073/pnas.1610531113
- Eastwood, S. L., Lyon, L., George, L., Andrieux, A., Job, D., and Harrison, P. J. (2007). Altered expression of synaptic protein mRNAs

- in STOP (MAP6) mutant mice. *J. Psychopharmacol.* 21, 635–644. doi: 10.1177/0269881106068825
- Edgar, P. F., Douglas, J. E., Cooper, G. J., Dean, B., Kydd, R., and Faull, R. L. (2000). Comparative proteome analysis of the hippocampus implicates chromosome 6q in schizophrenia. *Mol. Psychiatry* 5, 85–90. doi: 10.1038/sj.mp.4000580
- Elie, A., Prezel, E., Guerin, C., Denarier, E., Ramirez-Rios, S., Serre, L., et al. (2015). Tau co-organizes dynamic microtubule and actin networks. *Sci. Rep.* 5:9964. doi: 10.1038/srep09964
- Emamzadeh, F. N. (2016). α -synuclein structure, functions, and interactions. *J. Res. Med. Sci.* 21:29. doi: 10.4103/1735-1995.181989
- Faller, E. M., Villeneuve, T. S., and Brown, D. L. (2009). MAP1a associated light chain 3 increases microtubule stability by suppressing microtubule dynamics. *Mol. Cell. Neurosci.* 41, 85–93. doi: 10.1016/j.mcn.2009.02.001
- Farah, C. A., Liazoghli, D., Perreault, S., Desjardins, M., Guimont, A., Anton, A., et al. (2005). Interaction of microtubule-associated protein-2 and p63: a new link between microtubules and rough endoplasmic reticulum membranes in neurons. *J. Biol. Chem.* 280, 9439–9449. doi: 10.1074/jbc.M412304200
- Farah, C. A., Perreault, S., Liazoghli, D., Desjardins, M., Anton, A., Lauzon, M., et al. (2006). Tau interacts with Golgi membranes and mediates their association with microtubules. *Cell Motil. Cytoskeleton* 63, 710–724. doi: 10.1002/cm.20157
- Findeisen, P., Muhlhausen, S., Dempewolf, S., Hertzog, J., Zietlow, A., Carlomagno, T., et al. (2014). Six subgroups and extensive recent duplications characterize the evolution of the eukaryotic tubulin protein family. *Genome Biol. Evol.* 6, 2274–2288. doi: 10.1093/gbe/evu187
- Fink, C. C., and Meyer, T. (2002). Molecular mechanisms of CaMKII activation in neuronal plasticity. *Curr. Opin. Neurobiol.* 12, 293–299. doi: 10.1016/s0959-4388(02)00327-6
- Fitzsimmons, J., Kubicki, M., Smith, K., Bushell, G., Estepar, R. S., Westin, C. E., et al. (2009). Diffusion tractography of the fornix in schizophrenia. *Schizophr. Res.* 107, 39–46. doi: 10.1016/j.schres.2008.10.022
- Föcking, M., Dicker, P., English, J. A., Schubert, K. O., Dunn, M. J., and Cotter, D. R. (2011). Common proteomic changes in the hippocampus in schizophrenia and bipolar disorder and particular evidence for involvement of cornu ammonis regions 2 and 3. *Arch. Gen. Psychiatry* 68, 477–488. doi: 10.1001/archgenpsychiatry.2011.43
- Fournet, V., de Lavilleon, G., Schweitzer, A., Giros, B., Andrieux, A., and Martres, M. P. (2012a). Both chronic treatments by epothilone D and fluoxetine increase the short-term memory and differentially alter the mood status of STOP/MAP6 KO mice. *J. Neurochem.* 123, 982–996. doi: 10.1111/jnc.12027
- Fournet, V., Jany, M., Fabre, V., Chali, F., Orsal, D., Schweitzer, A., et al. (2010). The deletion of the microtubule-associated STOP protein affects the serotonergic mouse brain network. *J. Neurochem.* 115, 1579–1594. doi: 10.1111/j.1471-4159.2010.07064.x
- Fournet, V., Schweitzer, A., Chevarin, C., Deloume, J. C., Hamon, M., Giros, B., et al. (2012b). The deletion of STOP/MAP6 protein in mice triggers highly altered mood and impaired cognitive performances. *J. Neurochem.* 121, 99–114. doi: 10.1111/j.1471-4159.2011.07615.x
- Fradley, R. L., O'Meara, G. F., Newman, R. J., Andrieux, A., Job, D., and Reynolds, D. S. (2005). STOP knockout and NMDA NR1 hypomorphic mice exhibit deficits in sensorimotor gating. *Behav. Brain Res.* 163, 257–264. doi: 10.1016/j.bbr.2005.05.012
- Fukata, Y., Itoh, T. J., Kimura, T., Menager, C., Nishimura, T., Shiromizu, T., et al. (2002a). CRMP-2 binds to tubulin heterodimers to promote microtubule assembly. *Nat. Cell Biol.* 4, 583–591. doi: 10.1038/ncb825
- Fukata, Y., Kimura, T., and Kaibuchi, K. (2002b). Axon specification in hippocampal neurons. *Neurosci. Res.* 43, 305–315. doi: 10.1016/s0168-0102(02)00062-7
- Fukuyama, K., Kato, R., Murata, M., Shiroyama, T., and Okada, M. (2019). Clozapine normalizes a glutamatergic transmission abnormality induced by an impaired NMDA receptor in the thalamocortical pathway via the activation of a group III metabotropic glutamate receptor. *Biomolecules* 9:234. doi: 10.3390/biom9060234
- Galiano, M. R., Bosc, C., Schweitzer, A., Andrieux, A., Job, D., and Hallak, M. E. (2004). Astrocytes and oligodendrocytes express different STOP protein isoforms. *J. Neurosci. Res.* 78, 329–337. doi: 10.1002/jnr.20260
- Gardiner, J., Overall, R., and Marc, J. (2011). The microtubule cytoskeleton acts as a key downstream effector of neurotransmitter signaling. *Synapse* 65, 249–256. doi: 10.1002/syn.20841
- Garvalov, B. K., Zuber, B., Bouchet-Marquis, C., Kudryashev, M., Gruska, M., Beck, M., et al. (2006). Luminal particles within cellular microtubules. *J. Cell Biol.* 174, 759–765. doi: 10.1083/jcb.200606074
- Gimenez, U., Boulan, B., Mauconduit, F., Taurel, F., Leclercq, M., Denarier, E., et al. (2017). 3D imaging of the brain morphology and connectivity defects in a model of psychiatric disorders: MAP6-KO mice. *Sci. Rep.* 7:10308. doi: 10.1038/s41598-017-10544-2
- Gleeson, J. G., Lin, P. T., Flanagan, L. A., and Walsh, C. A. (1999). Doublecortin is a microtubule-associated protein and is expressed widely by migrating neurons. *Neuron* 23, 257–271. doi: 10.1016/s0896-6273(00)80778-3
- Gong, X., Tan, M., Gao, Y., Chen, K., and Guo, G. (2016). CRMP-5 interacts with actin to regulate neurite outgrowth. *Mol. Med. Rep.* 13, 1179–1185. doi: 10.3892/mmr.2015.4662
- Gonzalez-Billault, C., Avila, J., and Cáceres, A. (2001). Evidence for the role of MAP1B in axon formation. *Mol. Biol. Cell* 12, 2087–2098. doi: 10.1091/mbc.12.7.2087
- Gory-Fauré, S., Windscheid, V., Bosc, C., Peris, L., Proietto, D., Franck, R., et al. (2006). STOP-like protein 21 is a novel member of the STOP family, revealing a Golgi localization of STOP proteins. *J. Biol. Chem.* 281, 28387–28396. doi: 10.1074/jbc.M603380200
- Gory-Fauré, S., Windscheid, V., Brocard, J., Montessuit, S., Tsutsumi, R., Denarier, E., et al. (2014). Non-microtubule localizations of microtubule-associated protein 6 (MAP6). *PLoS One* 9:e114905. doi: 10.1371/journal.pone.0114905
- Goshima, Y., Nakamura, F., Strittmatter, P., and Strittmatter, S. M. (1995). Collapsin-induced growth cone collapse mediated by an intracellular protein related to UNC-33. *Nature* 376, 509–514. doi: 10.1038/376509a0
- Gozes, I. (2011). Microtubules, schizophrenia and cognitive behavior: preclinical development of davunetide (NAP) as a peptide-drug candidate. *Peptides* 32, 428–431. doi: 10.1016/j.peptides.2010.10.030
- Gozes, I., and Divinski, I. (2007). NAP, a neuroprotective drug candidate in clinical trials, stimulates microtubule assembly in the living cell. *Curr. Alzheimer Res.* 4, 507–509. doi: 10.2174/156720507783018208
- Greaves, J., and Chamberlain, L. H. (2011). DHHC palmitoyl transferases: substrate interactions and (patho)physiology. *Trends Biochem. Sci.* 36, 245–253. doi: 10.1016/j.tibs.2011.01.003
- Griffith, L. M., and Pollard, T. D. (1982). Cross-linking of actin filament networks by sdf-association and actin-binding macromolecules. *J. Biol. Chem.* 257, 9135–9142. doi: 10.1016/s0021-9258(18)34253-4
- Grossman, S. D., Futter, M., Snyder, G. L., Allen, P. B., Näärn, A. C., Greengard, P., et al. (2004). Spinophilin is phosphorylated by Ca²⁺/calmodulin-dependent protein kinase II resulting in regulation of its binding to F-actin. *J. Neurochem.* 90, 317–324. doi: 10.1111/j.1471-4159.2004.02491.x
- Gu, Y., Jukkola, P., Wang, Q., Esparza, T., Zhao, Y., Brody, D., et al. (2017). Polarity of varicosity initiation in central neuron mechanosensation. *J. Cell Biol.* 216, 2179–2199. doi: 10.1083/jcb.201606065
- Guillaud, L., Bosc, C., Fourest-Lieuvin, A., Denarier, E., Pirolet, F., Lafanechere, L., et al. (1998). STOP proteins are responsible for the high degree of microtubule stabilization observed in neuronal cells. *J. Cell Biol.* 142, 167–179. doi: 10.1083/jcb.142.1.167
- Haochen-Kleiman, G., Sragovich, S., Karmon, G., Gao, A. Y. L., Grigg, I., Pasmanik-Chor, M., et al. (2018). Activity-dependent neuroprotective protein deficiency models synaptic and developmental phenotypes of autism-like syndrome. *J. Clin. Invest.* 128, 4956–4969. doi: 10.1172/JCI98199
- Hamdan, H., Lim, B. C., Torii, T., Joshi, A., Konning, M., Smith, C., et al. (2020). Mapping axon initial segment structure and function by multiplexed proximity biotinylation. *Nat. Commun.* 11:100. doi: 10.1038/s41467-019-13658-5
- Harada, A., Oguchi, K., Okabe, S., Kuno, J., Terada, S., Ohshima, T., et al. (1994). Altered microtubule organization in small-calibre axons of mice lacking tau protein. *Nature* 369, 488–491. doi: 10.1038/369488a0
- Hausrat, T. J., Radwicz, J., Lombino, F. L., Breiden, P., and Kneussel, M. (2020). α - and β -tubulin isoforms are differentially expressed during brain development. *Dev. Neurobiol.* doi: 10.1002/dneu.22745. [Epub ahead of print].

- Hayashi, M. A., Portaro, F. C., Bastos, M. F., Guerreiro, J. R., Oliveira, V., Gorrao, S. S., et al. (2005). Inhibition of NUDEL (nuclear distribution element-like)-oligopeptidase activity by disrupted-in-schizophrenia 1. *Proc. Natl. Acad. Sci. U S A* 102, 3828–3833. doi: 10.1073/pnas.0500330102
- Hedgecock, E. M., Culotti, J. G., Thomson, J. N., and Perkins, L. A. (1985). Axonal guidance mutants of *Caenorhabditis elegans* identified by filling sensory neurons with fluorescein dyes. *Dev. Biol.* 111, 158–170. doi: 10.1016/0012-1606(85)90443-9
- Hensley, K., and Kursula, P. (2016). Collapsin response mediator protein-2 (CRMP2) is a plausible etiological factor and potential therapeutic target in Alzheimer's disease: comparison and contrast with microtubule-associated protein tau. *J. Alzheimers Dis.* 53, 1–14. doi: 10.3233/JAD-160076
- Hensley, K., Venkova, K., Christov, A., Gunning, W., and Park, J. (2011). Collapsin response mediator protein-2: an emerging pathologic feature and therapeutic target for neurodegeneration. *Mol. Neurobiol.* 43, 180–191. doi: 10.1007/s12035-011-8166-4
- Hernández-Vega, A., Braun, M., Scharred, L., Jahnel, M., Wegmann, S., Hyman, B. T., et al. (2017). Local nucleation of microtubule bundles through tubulin concentration into a condensed tau phase. *Cell Rep.* 20, 2304–2312. doi: 10.1016/j.celrep.2017.08.042
- Herzog, W., and Weber, K. (1978). Fractionation of brain microtubule-associated proteins. Isolation of two different proteins which stimulate tubulin polymerization *in vitro*. *Eur. J. Biochem.* 92, 1–8. doi: 10.1111/j.1432-1033.1978.tb12716.x
- Huber, G., and Matus, A. (1984). Differences in the cellular distributions of two microtubule-associated proteins, MAP1 and MAP2, in rat brain. *J. Neurosci.* 4, 151–160. doi: 10.1523/JNEUROSCI.04-01-00151.1984
- Ikegami, S., Harada, A., and Hirokawa, N. (2000). Muscle weakness, hyperactivity and impairment in fear conditioning in tau-deficient mice. *Neurosci. Lett.* 279, 129–132. doi: 10.1016/s0304-3940(99)00964-7
- Inaba, H., Yamamoto, T., Iwasaki, T., Kabir, A. M. R., Kakugo, A., Sada, K., et al. (2019). Stabilization of microtubules by encapsulation of the GFP using a Tau-derived peptide. *Chem. Commun.* 55, 9072–9075. doi: 10.1039/c9cc04345d
- Ivashko-Pachima, Y., and Gozes, I. (2019). A novel microtubule-tau association enhancer and neuroprotective drug candidate: Ac-SIKP. *Front. Cell. Neurosci.* 13:435. doi: 10.3389/fncel.2019.00435
- Ivashko-Pachima, Y., Maor-Nof, M., and Gozes, I. (2019). NAP (davunetide) preferential interaction with dynamic 3-repeat Tau explains differential protection in selected tauopathies. *PLoS One* 14:e0213666. doi: 10.1371/journal.pone.0213666
- Ivashko-Pachima, Y., Sayas, C. L., Malishkevich, A., and Gozes, I. (2017). ADNP/NAP dramatically increase microtubule end-binding protein-Tau interaction: a novel avenue for protection against tauopathy. *Mol. Psychiatry* 22, 1335–1344. doi: 10.1038/mp.2016.255
- Iwanaga, T., Hozumi, Y., and Takahashi-Iwanaga, H. (2011). Immunohistochemical demonstration of dopamine receptor D2R in the primary cilia of the mouse pituitary gland. *Biomed. Res.* 32, 225–235. doi: 10.2220/biomedres.32.225
- Jacobs, S., Lie, D. C., DeCicco, K. L., Shi, Y., DeLuca, L. M., Gage, F. H., et al. (2006). Retinoic acid is required early during adult neurogenesis in the dentate gyrus. *Proc. Natl. Acad. Sci. U S A* 103, 3902–3907. doi: 10.1073/pnas.0511294103
- Jiang, T., Zhang, G., Liang, Y., Cai, Z., Liang, Z., Lin, H., et al. (2020). PlexinA3 interacts with CRMP2 to mediate sema3A signalling during dendritic growth in cultured cerebellar granule neurons. *Neuroscience* 434, 83–92. doi: 10.1016/j.neuroscience.2020.02.008
- Job, D., Fischer, E. H., and Margolis, R. L. (1981). Rapid disassembly of cold-stable microtubules by calmodulin. *Proc. Natl. Acad. Sci. U S A* 78, 4679–4682. doi: 10.1073/pnas.78.8.4679
- Job, D., Rauch, C. T., Fischer, E. H., and Margolis, R. L. (1982). Recycling of cold-stable microtubules: evidence that cold stability is due to substoichiometric polymer blocks. *Biochemistry* 21, 509–515. doi: 10.1021/bi00532a015
- Job, D., Rauch, C. T., and Margolis, R. L. (1987). High concentrations of STOP protein induce a microtubule super-stable state. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 148, 429–434. doi: 10.1016/0006-291x(87)91129-6
- Jonckheere, J., Deloulme, J.-C., Dall'igna, G., Chauliac, N., Pelluet, A., Nguon, A.-S., et al. (2018). Short- and long-term efficacy of electroconvulsive stimulation in animal models of depression: the essential role of neuronal survival. *Brain Stimul.* 11, 1336–1347. doi: 10.1016/j.brs.2018.08.001
- Jones, C., Watson, D., and Fone, K. (2011). Animal models of schizophrenia: animal models of schizophrenia. *Br. J. Pharmacol.* 164, 1162–1194. doi: 10.1111/j.1476-5381.2011.01386.x
- Joseph, B., Narayanaswamy, J. C., and Venkatasubramanian, G. (2015). Insight in schizophrenia: relationship to positive, negative and neurocognitive dimensions. *Indian J. Psychol. Med.* 37, 5–11. doi: 10.4103/0253-7176.150797
- Kadavath, H., Hofele, R. V., Biernat, J., Kumar, S., Tepper, K., Urlaub, H., et al. (2015). Tau stabilizes microtubules by binding at the interface between tubulin heterodimers. *Proc. Natl. Acad. Sci. U S A* 112, 7501–7506. doi: 10.1073/pnas.1504081112
- Kapitein, L. C., Yau, K. W., Gouveia, S. M., van der Zwan, W. A., Wulf, P. S., Keizer, N., et al. (2011). NMDA receptor activation suppresses microtubule growth and spine entry. *J. Neurosci.* 31, 8194–8209. doi: 10.1523/JNEUROSCI.6215-10.2011
- Kapur, S. (2003). Psychosis as a state of aberrant salience: a framework linking biology, phenomenology, and pharmacology in schizophrenia. *Am. J. Psychiatry* 160, 13–23. doi: 10.1176/appi.ajp.160.1.13
- Kar, S., Fan, J., Smith, M. J., Goedert, M., and Amos, L. A. (2003). Repeat motifs of tau bind to the insides of microtubules in the absence of taxol. *EMBO J.* 22, 70–77. doi: 10.1093/emboj/cdg001
- Kawano, Y., Yoshimura, T., Tsuboi, D., Kawabata, S., Kaneko-Kawano, T., Shirataki, H., et al. (2005). CRMP-2 is involved in kinesin-1-dependent transport of the Sra-1/WAVE1 complex and axon formation. *Mol. Cell. Biol.* 25, 9920–9935. doi: 10.1128/MCB.25.22.9920-9935.2005
- Kedracka-Krok, S., Swiderska, B., Jankowska, U., Skupien-Rabian, B., Solich, J., Buczak, K., et al. (2015). Clozapine influences cytoskeleton structure and calcium homeostasis in rat cerebral cortex and has a different proteomic profile than risperidone. *J. Neurochem.* 132, 657–676. doi: 10.1111/jnc.13007
- Kellogg, E. H., Hejab, N. M. A., Poepsel, S., Downing, K. H., DiMaio, F., and Nogales, E. (2018). Near-atomic model of microtubule-tau interactions. *Science* 360, 1242–1246. doi: 10.1126/science.aat1780
- Kendi, M., Kendi, A. T. K., Lehericy, S., Ducros, M., Lim, K. O., Ugurbil, K., et al. (2008). Structural and diffusion tensor imaging of the fornix in childhood- and adolescent-onset schizophrenia. *J. Am. Acad. Child Adolesc. Psychiatry* 47, 826–832. doi: 10.1097/CHI.0b013e318172ef36
- Khazaei, M. R., Girouard, M. P., Alchini, R., Ong Tone, S., Shimada, T., Bedstedt, S., et al. (2014). Collapsin response mediator protein 4 regulates growth cone dynamics through the actin and microtubule cytoskeleton. *J. Biol. Chem.* 289, 30133–30143. doi: 10.1074/jbc.M114.570440
- Kirima, J., and Oiwa, K. (2018). Flagellar-associated Protein FAP85 is a microtubule inner protein that stabilizes microtubules. *Cell Struct. Funct.* 43, 1–14. doi: 10.1247/csf.17023
- Koide, T., Aleksic, B., Ito, Y., Usui, H., Yoshimi, A., Inada, T., et al. (2010). A two-stage case-control association study of the dihydropyrimidinase-like 2 gene (DPYSL2) with schizophrenia in Japanese subjects. *J. Hum. Genet.* 55, 469–472. doi: 10.1038/jhg.2010.38
- Kolman, A. (2004). BMS-310705 bristol-myers squibb/GBF. *Curr. Opin. Investig. Drugs* 5, 1292–1297.
- Lacroix, B., van Dijk, J., Gold, N. D., Guizetti, J., Aldrian-Herrada, G., Rogowski, K., et al. (2010). Tubulin polyglutamylation stimulates spastin-mediated microtubule severing. *J. Cell Biol.* 189, 945–954. doi: 10.1083/jcb.201001024
- Lai, M., Wang, F., Rohan, J. G., Maeno-Hikichi, Y., Chen, Y., Zhou, Y., et al. (2005). A Ca^{2+} channel complex for selective surface expression of Ca^{2+} channels in neurons. *Nat. Neurosci.* 8, 435–442. doi: 10.1038/nn1418
- Lasser, M., Tiber, J., and Lowery, L. A. (2018). The role of the microtubule cytoskeleton in neurodevelopmental disorders. *Front. Cell. Neurosci.* 12:165. doi: 10.3389/fncel.2018.00165
- Leaf, A., and Von Zastrow, M. (2015). Dopamine receptors reveal an essential role of IFT-B, KIF17 and Rab23 in delivering specific receptors to primary cilia. *Elife* 4:e06996. doi: 10.7554/eLife.06996

- Lee, J. C., Frigon, R. P., and Timasheff, S. N. (1975). Structural stability of calf brain microtubule protein. *Ann. N Y Acad. Sci.* 253, 284–291. doi: 10.1111/j.1749-6632.1975.tb19207.x
- Lee, J. H., and Gleeson, J. G. (2010). The role of primary cilia in neuronal function. *Neurobiol. Dis.* 38, 167–172. doi: 10.1016/j.nbd.2009.12.022
- Lee, H., Joo, J., Nah, S. S., Kim, J. W., Kim, H. K., Kwon, J. T., et al. (2015). Changes in Dpysl2 expression are associated with prenatally stressed rat offspring and susceptibility to schizophrenia in humans. *Int. J. Mol. Med.* 35, 1574–1586. doi: 10.3892/ijmm.2015.2161
- Lee, S.-H., Kubicki, M., Asami, T., Seidman, L. J., Goldstein, J. M., Meshulam-Gately, R. L., et al. (2013). Extensive white matter abnormalities in patients with first-episode schizophrenia: a diffusion tensor imaging (DTI) study. *Schizophr. Res.* 143, 231–238. doi: 10.1016/j.schres.2012.11.029
- Leenders, A. G., Lin, L., Huang, L.-D., Gerwin, C., Lu, P. H., and Sheng, Z. H. (2008). The role of MAP1A light chain 2 in synaptic surface retention of Cav2.2 channels in hippocampal neurons. *J. Neurosci.* 28, 11333–11346. doi: 10.1523/JNEUROSCI.3078-08.2008
- Lefevre, J., Savarin, P., Gans, P., Hamon, L., Clement, M. J., David, M. O., et al. (2013). Structural basis for the association of MAP6 protein with microtubules and its regulation by calmodulin. *J. Biol. Chem.* 288, 24910–24922. doi: 10.1074/jbc.M113.457267
- Lei, P., Ayton, S., Finkelstein, D. L., Spoorri, L., Ciccotosto, G. D., Wright, D. K., et al. (2012). Tau deficiency induces parkinsonism with dementia by impairing APP-mediated iron export. *Nat. Med.* 18, 291–295. doi: 10.1038/nm.2613
- Lemonidis, K., Sanchez-Perez, M. C., and Chamberlain, L. H. (2015). Identification of a novel sequence motif recognized by the ankyrin repeat domain of zDHHC17/13 S-acyltransferases. *J. Biol. Chem.* 290, 21939–21950. doi: 10.1074/jbc.M115.657668
- Li, Y., and Black, M. (1996). Microtubule assembly and turnover in growing axons. *J. Neurosci.* 16, 531–544. doi: 10.1523/JNEUROSCI.16-02-00531.1996
- Lim, R. W., and Halpain, S. (2000). Regulated association of microtubule-associated protein 2 (MAP2) with Src and Grb2: evidence for MAP2 as a scaffolding protein. *J. Biol. Chem.* 275, 20578–20587. doi: 10.1074/jbc.M001887200
- Lin, P.-C., Chan, P. M., Hall, C., and Manser, E. (2011). Collapsin response mediator proteins (CRMPs) are a new class of microtubule-associated protein (MAP) that selectively interacts with assembled microtubules via a taxol-sensitive binding interaction. *J. Biol. Chem.* 286, 41466–41478. doi: 10.1074/jbc.M111.283580
- Liu, Y. F., Sowell, S. M., Luo, Y., Chaubey, A., Cameron, R. S., Kim, H. G., et al. (2015). Autism and intellectual disability-associated KIRREL3 interacts with neuronal proteins MAPIB and MYO16 with potential roles in neurodevelopment. *PLoS One* 10:e0123106. doi: 10.1371/journal.pone.0123106
- Luck, D., Malla, A. K., Joobar, R., and Lepage, M. (2010). Disrupted integrity of the fornix in first-episode schizophrenia. *Schizophr. Res.* 119, 61–64. doi: 10.1016/j.schres.2010.03.027
- Ma, Q.-L., Zuo, X., Yang, F., Ubeda, O. J., Gant, D. J., Alaverdyan, M., et al. (2014). Loss of MAP function leads to hippocampal synapse loss and deficits in the Morris Water Maze with aging. *J. Neurosci.* 34, 7124–7136. doi: 10.1523/JNEUROSCI.3439-13.2014
- Maden, M. (2007). Retinoic acid in the development, regeneration and maintenance of the nervous system. *Nat. Rev. Neurosci.* 8, 755–765. doi: 10.1038/nrn2212
- Marchisella, F., Coffey, E. T., and Hollos, P. (2016). Microtubule and microtubule associated protein anomalies in psychiatric disease. *Cytoskeleton* 73, 596–611. doi: 10.1002/cm.21300
- Margolis, R. L., and Rauch, C. T. (1981). Characterization of rat brain crude extract microtubule assembly: correlation of cold stability with the phosphorylation state of a microtubule-associated 64K protein. *Biochemistry* 20, 4451–4458. doi: 10.1021/bi00518a033
- Margolis, R. L., Rauch, C. T., and Job, D. (1986). Purification and assay of cold-stable microtubules and STOP protein. *Methods Enzymol.* 134, 160–170. doi: 10.1016/0076-6879(86)34085-0
- Margolis, R. L., Rauch, C. T., Pirollet, F., and Job, D. (1990). Specific association of STOP protein with microtubules *in vitro* and with stable microtubules in mitotic spindles of cultured cells. *EMBO J.* 9, 4095–4102. doi: 10.1002/j.1460-2075.1990.tb07631.x
- Marley, A., and von Zastrow, M. (2010). DISC1 regulates primary cilia that display specific dopamine receptors. *PLoS One* 5:e10902. doi: 10.1371/journal.pone.0010902
- Martins-de-Souza, D., Gattaz, W. F., Schmitt, A., Rewerts, C., Maccarrone, G., Dias-Neto, E., et al. (2009). Prefrontal cortex shotgun proteome analysis reveals altered calcium homeostasis and immune system imbalance in schizophrenia. *Eur. Arch. Psychiatry Clin. Neurosci.* 259, 151–163. doi: 10.1007/s00406-008-0847-2
- McCarley, R. W., Wible, C. G., Frumin, M., Hirayasu, Y., Levitt, J. J., Fischer, I. A., et al. (1999). MRI anatomy of schizophrenia. *Biol. Psychiatry* 45, 1099–1119. doi: 10.1016/s0006-3223(99)00018-9
- Merenlender-Wagner, A., Malishkevich, A., Shemer, Z., Udawela, M., Gibbons, A., Scarr, E., et al. (2015). Autophagy has a key role in the pathophysiology of schizophrenia. *Mol. Psychiatry* 20, 126–132. doi: 10.1038/mp.2013.174
- Merenlender-Wagner, A., Pikman, R., Giladi, E., Andrieux, A., and Gozes, I. (2010). NAP (davunetide) enhances cognitive behavior in the STOP heterozygous mouse—a microtubule-peptide model of schizophrenia. *Peptides* 31, 1368–1373. doi: 10.1016/j.peptides.2010.04.011
- Merenlender-Wagner, A., Shemer, Z., Touloumi, O., Lagoudaki, R., Giladi, E., Andrieux, A., et al. (2014). New horizons in schizophrenia treatment: autophagy protection is coupled with behavioral improvements in a mouse model of schizophrenia. *Autophagy* 10, 2324–2332. doi: 10.4161/15548627.2014.984274
- Mishra, S., Kelly, K. K., Rumian, N. L., and Siegenthaler, J. A. (2018). Retinoic acid is required for neural stem and progenitor cell proliferation in the adult hippocampus. *Stem Cell Reports* 10, 1705–1720. doi: 10.1016/j.stemcr.2018.04.024
- Mitchison, T., and Kirschner, M. (1984). Dynamic instability of microtubule growth. *Nature* 312, 237–242. doi: 10.1038/312237a0
- Mohan, R., and John, A. (2015). Microtubule-associated proteins as direct crosslinkers of actin filaments and microtubules. *IURMB Life* 67, 395–403. doi: 10.1002/iub.1384
- Monroy, B. Y., Tan, T. C., Odaman, J. M., Han, J. S., Simo, S., Niwa, S., et al. (2020). A combinatorial MAP code dictates polarized microtubule transport. *Dev. Cell* 53, 60.e4–72.e4. doi: 10.1016/j.devcel.2020.01.029
- Morderer, D., Nikolaienko, O., Skrypkina, I., Cherkas, V., Tsyba, L., Bedan, P., et al. (2012). Endocytic adaptor protein intersectin 1 forms a complex with microtubule stabilizer STOP in neurons. *Gene* 505, 360–364. doi: 10.1016/j.gene.2012.06.061
- Morita, T., and Sobue, K. (2009). Specification of neuronal polarity regulated by local translation of CRMP2 and Tau via the mTOR-p70S6K pathway. *J. Biol. Chem.* 284, 27734–27745. doi: 10.1074/jbc.M109.008177
- Morris, J. A., Kandpal, G., Ma, L., and Austin, C. P. (2003). DISC1 (Disrupted-In-Schizophrenia 1) is a centrosome-associated protein that interacts with MAPIA, MIPT3, ATP4/5 and NUDEL: regulation and loss of interaction with mutation. *Hum. Mol. Genet.* 12, 1591–1608. doi: 10.1093/hmg/ddg162
- Morris, M., Maeda, S., Vossel, K., and Mucke, L. (2011). The many faces of tau. *Neuron* 70, 410–426. doi: 10.1016/j.neuron.2011.04.009
- Moutin, M.-J., Bosc, C., Peris, L., and Andrieux, A. (2020). Tubulin post-translational modifications control neuronal development and functions. *Dev. Neurobiol.* doi: 10.1002/dneu.22774 [Epub ahead of print].
- Müller, C. S., Haupt, A., Bickl, W., Schindler, J., Knaus, H. G., Meissner, M., et al. (2010). Quantitative proteomics of the Cav2 channel nano-environments in the mammalian brain. *Proc. Natl. Acad. Sci. U S A* 107, 14950–14957. doi: 10.1073/pnas.1005940107
- Muñoz-Estrada, J., Lora-Castellanos, A., Meza, I., Alarcón Elizalde, S., and Benitez-King, G. (2018). Primary cilia formation is diminished in schizophrenia and bipolar disorder: a possible marker for these psychiatric diseases. *Schizophr. Res.* 195, 412–420. doi: 10.1016/j.schres.2017.08.055
- Munton, R. P., Tweedie-Cullen, R., Livingstone-Zatchej, M., Weinandy, F., Waidelich, M., Longo, D., et al. (2007). Qualitative and quantitative analyses of protein phosphorylation in naive and stimulated mouse synaptosomal preparations. *Mol. Cell Proteomics* 6, 283–293. doi: 10.1074/mcp.M600046-MCP200

- Nakata, K., and Ujike, H. (2004). [The human dihydropyrimidinase-related protein 2 (DRP-2) gene on chromosome 8p21 is associated with paranoid-type schizophrenia]. *Nihon Shinkei Seishin Yakurigaku Zasshi* 24, 33–37.
- Nakata, K., Ujike, H., Sakai, A., Takaki, M., Imamura, T., Tanaka, Y., et al. (2003). The human dihydropyrimidinase-related protein 2 gene on chromosome 8p21 is associated with paranoid-type schizophrenia. *Biol. Psychiatry* 53, 571–576. doi: 10.1016/s0006-3223(02)01729-8
- Niisato, E., Nagai, J., Yamashita, N., Abe, T., Kiyonari, H., Goshima, Y., et al. (2012). CRMP4 suppresses apical dendrite bifurcation of CA1 pyramidal neurons in the mouse hippocampus. *Dev. Neurobiol.* 72, 1447–1457. doi: 10.1002/dneu.22007
- Niisato, E., Nagai, J., Yamashita, N., Nakamura, F., Goshima, Y., and Ohshima, T. (2013). Phosphorylation of CRMP2 is involved in proper bifurcation of the apical dendrite of hippocampal CA1 pyramidal neurons. *Dev. Neurobiol.* 73, 142–151. doi: 10.1002/dneu.22048
- Nishimura, T., Fukata, Y., Kato, K., Yamaguchi, T., Matsuura, Y., Kamiguchi, H., et al. (2003). CRMP-2 regulates polarized Numb-mediated endocytosis for axon growth. *Nat. Cell Biol.* 5, 819–826. doi: 10.1038/nbc1039
- Niwa, S., Nakamura, F., Tomabechi, Y., Aoki, M., Shigematsu, H., Matsumoto, T., et al. (2017). Structural basis for CRMP2-induced axonal microtubule formation. *Sci. Rep.* 7:10681. doi: 10.1038/s41598-017-11031-4
- Okabe, S., and Hirokawa, N. (1990). Turnover of fluorescently labeled tubulin and actin in the axon. *Nature* 343, 479–482. doi: 10.1038/343479a0
- Oliveira da Silva, M. I., and Liz, M. A. (2020). Linking α -synuclein to the actin cytoskeleton: consequences to neuronal function. *Front. Cell Dev. Biol.* 8:787. doi: 10.3389/fcell.2020.00787
- Owa, M., Uchihashi, T., Yanagisawa, H. A., Yamano, T., Iguchi, H., Fukuzawa, H., et al. (2019). Inner lumen proteins stabilize doublet microtubules in cilia and flagella. *Nat. Commun.* 10:1143. doi: 10.1038/s41467-019-09051-x
- Oz, S., Kapitanov, O., Ivashco-Pachima, Y., Malishkevich, A., Giladi, E., Skalka, N., et al. (2014). The NAP motif of activity-dependent neuroprotective protein (ADNP) regulates dendritic spines through microtubule end binding proteins. *Mol. Psychiatry* 19, 1115–1124. doi: 10.1038/mp.2014.97
- Ozer, R. S., and Halpain, S. (2000). Phosphorylation-dependent localization of microtubule-associated protein MAP2c to the actin cytoskeleton. *Mol. Biol. Cell* 11, 3573–3587. doi: 10.1091/mbc.11.10.3573
- Pabion, M., Job, D., and Margolis, R. L. (1984). Sliding of STOP proteins on microtubules. *Biochemistry* 23, 6642–6648. doi: 10.1021/bi00321a055
- Palenzuela, R., Gutiérrez, Y., Draffin, J. E., Lario, A., Benoist, M., and Esteban, J. A. (2017). MAP1B light chain modulates synaptic transmission via AMPA receptor intracellular trapping. *J. Neurosci.* 37, 9945–9963. doi: 10.1523/JNEUROSCI.0505-17.2017
- Pamula, M. C., Ti, S.-C., and Kapoor, T. M. (2016). The structured core of human β tubulin confers isotype-specific polymerization properties. *J. Cell Biol.* 213, 425–433. doi: 10.1083/jcb.201603050
- Panda, D., Miller, H. P., Banerjee, A., Ludueña, R. F., and Wilson, L. (1994). Microtubule dynamics *in vitro* are regulated by the tubulin isotype composition. *Proc. Natl. Acad. Sci. U S A* 91, 11358–11362. doi: 10.1073/pnas.91.24.11358
- Park, S. M., Liu, G., Kubal, A., Fury, M., Cao, L., and Marx, S. O. (2004). Direct interaction between BKCa potassium channel and microtubule-associated protein 1A. *FEBS Lett.* 570, 143–148. doi: 10.1016/j.febslet.2004.06.037
- Paul, D. M., Mantell, J., Borucu, U., Coombs, J., Surridge, K. J., Squire, J. M., et al. (2020). *In situ cryo-electron tomography reveals filamentous actin within the microtubule lumen.* *J. Cell Biol.* 219:e201911154. doi: 10.1083/jcb.2019.11154
- Pedrotti, B., Colombo, R., and Islam, K. (1994). Interactions of microtubule-associated protein MAP2 with unpolymerized and polymerized tubulin and actin using a 96-well microtiter plate solid-phase immunoassay. *Biochemistry* 33, 8798–8806. doi: 10.1021/bi00195a023
- Peng, J., Kim, M. J., Cheng, D., Duong, D. M., Gygi, S. P., and Sheng, M. (2004). Semiquantitative proteomic analysis of rat forebrain postsynaptic density fractions by mass spectrometry. *J. Biol. Chem.* 279, 21003–21011. doi: 10.1074/jbc.M400103200
- Peris, L., Bisbal, M., Martínez-Hernández, J., Sacudi, Y., Jonckheere, J., Rolland, M., et al. (2018). A key function for microtubule-associated-protein 6 in activity-dependent stabilisation of actin filaments in dendritic spines. *Nat. Commun.* 9:3775. doi: 10.1038/s41467-018-05869-z
- Pirollet, F., Derancourt, J., Haiech, J., Job, D., and Margolis, R. L. (1992a). Ca^{2+} -calmodulin regulated effectors of microtubule stability in bovine brain. *Biochemistry* 31, 8849–8855. doi: 10.1021/bi00152a022
- Pirollet, F., Job, D., Fischer, E. H., and Margolis, R. L. (1983). Purification and characterization of sheep brain cold-stable microtubules. *Proc. Natl. Acad. Sci. U S A* 80, 1560–1564. doi: 10.1073/pnas.80.6.1560
- Pirollet, F., Margolis, R. L., and Job, D. (1992b). Ca^{2+} -calmodulin regulated effectors of microtubule stability in neuronal tissues. *Biochim. Biophys. Acta* 1160, 113–119. doi: 10.1016/0167-4838(92)90044-e
- Pirollet, F., Rauch, C. T., Job, D., and Margolis, R. L. (1989). Monoclonal antibody to microtubule-associated STOP protein: affinity purification of neuronal STOP activity and comparison of antigen with activity in neuronal and nonneuronal cell extracts. *Biochemistry* 28, 835–842. doi: 10.1021/bi00428a064
- Portran, D., Schaedel, L., Xu, Z., Thery, M., and Nachury, M. V. (2017). Tubulin acetylation protects long-lived microtubules against mechanical ageing. *Nat. Cell Biol.* 19, 391–398. doi: 10.1038/nbc3481
- Powell, K. J., Hori, S. E., Leslie, R., Andrieux, A., Schellinck, H., Thorne, M., et al. (2007). Cognitive impairments in the STOP null mouse model of schizophrenia. *Behav. Neurosci.* 121, 826–835. doi: 10.1037/0735-7044.121.5.826
- Proffitt, M. F., Deurveilher, S., Robertson, G. S., Rusak, B., and Semba, K. (2016). Disruptions of sleep/wake patterns in the stable tubule only polypeptide (STOP) null mouse model of schizophrenia. *Schizophr. Bull.* 42, 1207–1215. doi: 10.1093/schbul/sbw017
- Qiang, L., Sun, X., Austin, T. O., Muralidharan, H., Jean, D. C., Liu, M., et al. (2018). Tau does not stabilize axonal microtubules but rather enables them to have long labile domains. *Curr. Biol.* 28, 2181.e4–2189.e4. doi: 10.1016/j.cub.2018.05.045
- Quach, T. T., Honnorat, J., Kolattukudy, P. E., Khanna, R., and Duchemin, A. M. (2015). CRMPs: critical molecules for neurite morphogenesis and neuropsychiatric diseases. *Mol. Psychiatry* 20, 1037–1045. doi: 10.1038/mp.2015.77
- Quach, T. T., Massicotte, G., Belin, M. F., Honnorat, J., Gasper, E. R., Devries, A. C., et al. (2008). CRMP3 is required for hippocampal CA1 dendritic organization and plasticity. *FASEB J.* 22, 401–409. doi: 10.1096/fj.07-9012com
- Quach, T. T., Wang, Y., Khanna, R., Chounlamountri, N., Auvergnon, N., Honnorat, J., et al. (2011). Effect of CRMP3 expression on dystrophic dendrites of hippocampal neurons. *Mol. Psychiatry* 16, 689–691. doi: 10.1038/mp.2011.6
- Quach, T. T., Wilson, S. M., Rogemond, V., Chounlamountri, N., Kolattukudy, P. E., Martinez, S., et al. (2013). Mapping CRMP3 domains involved in dendrite morphogenesis and voltage-gated calcium channel regulation. *J. Cell Sci.* 126, 4262–4273. doi: 10.1242/jcs.131409
- Quednow, B. B., Csomor, P. A., Chmiel, J., Beck, T., and Vollenweider, F. X. (2008). Sensorimotor gating and attentional set-shifting are improved by the mu-opioid receptor agonist morphine in healthy human volunteers. *Int. J. Neuropsychopharmacol.* 11, 655–669. doi: 10.1017/S1461145707008322
- Quinn, C. C., Chen, E., Kinjo, T. G., Kelly, G., Bell, A. W., Elliott, R. C., et al. (2003). TUC-4b, a novel TUC family variant, regulates neurite outgrowth and associates with vesicles in the growth cone. *J. Neurosci.* 23, 2815–2823. doi: 10.1523/JNEUROSCI.23-07-02815.2003
- Ramirez-Rios, S., Denarier, E., Prezel, E., Vinit, A., Stoppin-Mellet, V., Devred, F., et al. (2016). Tau antagonizes end-binding protein tracking at microtubule ends through a phosphorylation-dependent mechanism. *Mol. Biol. Cell* 27, 2924–2934. doi: 10.1091/mbc.E16-01-0029
- Ramkumar, A., Jong, B. Y., and Ori-McKenney, K. M. (2018). ReMapping the microtubule landscape: how phosphorylation dictates the activities of microtubule-associated proteins: phosphorylation of microtubule-associated proteins. *Dev. Dyn.* 247, 138–155. doi: 10.1002/dvdy.24599
- Regan, P., Piers, T., Yi, J.-H., Kim, D.-H., Huh, S., Park, S. J., et al. (2015). Tau phosphorylation at serine 396 residue is required for hippocampal LTD. *J. Neurosci.* 35, 4804–4812. doi: 10.1523/JNEUROSCI.2842-14.2015
- Reiter, J. F., and Leroux, M. R. (2017). Genes and molecular pathways underpinning dliopathies. *Nat. Rev. Mol. Cell Biol.* 18, 533–547. doi: 10.1038/nrm.2017.60

- Richard, M., Sacquet, J., Jany, M., Schweitzer, A., Jourdan, F., Andrieux, A., et al. (2009). STOP proteins contribute to the maturation of the olfactory system. *Mol. Cell. Neurosci.* 41, 120–134. doi: 10.1016/j.mcn.2009.02.004
- Roger, B., Al-Bassam, J., Dehmelt, L., Milligan, R. A., and Halpain, S. (2004). MAP2c, but not tau, binds and bundles F-actin via its microtubule binding domain. *Curr. Biol.* 14, 363–371. doi: 10.1016/j.cub.2004.01.058
- Rosslenbroich, V., Dai, L., Baader, S. L., Noegel, A. A., Gieselmann, V., and Kappler, J. (2005). Collapsin response mediator protein-4 regulates F-actin bundling. *Exp. Cell Res.* 310, 434–444. doi: 10.1016/j.yexcr.2005.08.005
- Rush, T., Roth, J. R., Thompson, S. J., Aldaher, A. R., Cochran, J. N., and Roberson, E. D. (2020). A peptide inhibitor of Tau-SH3 interactions ameliorates amyloid- β toxicity. *Neurobiol. Dis.* 134:104668. doi: 10.1016/j.nbd.2019.104668
- Salatino-Oliviera, A., Wagner, F., Akutagawa-Martins, G. C., Bruxel, E. M., Gørro, J. P., Zeni, C., et al. (2016). MAP1B and NOS1 genes are associated with working memory in youths with attention-deficit/hyperactivity disorder. *Eur. Arch. Psychiatry Clin. Neurosci.* 266, 359–366. doi: 10.1007/s00406-015-0626-9
- Sanders, A. A. W. M., and Kaverina, I. (2015). Nucleation and dynamics of golgi-derived microtubules. *Front. Neurosci.* 9:431. doi: 10.3389/fnins.2015.00431
- Saudou, F., and Humbert, S. (2016). The biology of huntingtin. *Neuron* 89, 910–926. doi: 10.1016/j.neuron.2016.02.003
- Sayas, C. L., Tortosa, E., Bollati, F., Ramirez-Rios, S., Arnal, I., and Avila, J. (2015). Tau regulates the localization and function of End Binding proteins in neuronal cells. *Springerplus* 4:L16. doi: 10.1186/2193-1801-4-S1-L16
- Schmidt, E. F., Shim, S.-O., and Strittmatter, S. M. (2008). Release of MICAL autoinhibition by semaphorin-plexin signaling promotes interaction with collapsin response mediator protein. *J. Neurosci.* 28, 2287–2297. doi: 10.1523/JNEUROSCI.5646-07.2008
- Schwenk, B. M., Lang, C. M., Höggl, S., Tahirovic, S., Orozco, D., Rentsch, K., et al. (2014). The FTLD risk factor TMEM106B and MAP6 control dendritic trafficking of lysosomes. *EMBO J.* 33, 450–467. doi: 10.1002/embj.201385857
- Sekine, X. Y., Algarate, P. T., Cafferty, X. W. B. J., and Strittmatter, X. S. M. (2019). Plexina2 and CRMP2 signaling complex is activated by nogo-a-liganded Ngr1 to restrict corticospinal axon sprouting after trauma. *J. Neurosci.* 39, 3204–3216. doi: 10.1523/JNEUROSCI.2996-18.2019
- Shepherd, A. M., Laurens, K. R., Matheson, S. L., Carr, V. J., and Green, M. J. (2012). Systematic meta-review and quality assessment of the structural brain alterations in schizophrenia. *Neurosci. Biobehav. Rev.* 36, 1342–1356. doi: 10.1016/j.neubiorev.2011.12.015
- Shimizu, H., Iwayama, Y., Yamada, K., Toyota, T., Minabe, Y., Nakamura, K., et al. (2006). Genetic and expression analyses of the STOP (MAP6) gene in schizophrenia. *Schizophr. Res.* 84, 244–252. doi: 10.1016/j.schres.2006.03.017
- Shimizu, S., Matsuzaki, S., Hattori, T., Kumamoto, N., Miyoshi, K., Katayama, T., et al. (2008). DISC1-kendrin interaction is involved in centrosomal microtubule network formation. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 377, 1051–1056. doi: 10.1016/j.bbrc.2008.10.100
- Siahaan, V., Krattenmacher, J., Hyman, A. A., Diez, S., Hernandez-Vega, A., Lansky, Z., et al. (2019). Kinetically distinct phases of tau on microtubules regulate kinesin motors and severing enzymes. *Nat. Cell Biol.* 21, 1086–1092. doi: 10.1038/s41556-019-0374-6
- Sloboda, R. D., Dentler, W. L., and Rosenbaum, J. L. (1976). Microtubule-associated proteins and the stimulation of tubulin assembly *in vitro*. *Biochemistry* 15, 4497–4505. doi: 10.1021/bi00665a026
- Soh, U. J. K., and Low, B. C. (2008). BNIP2 extra long inhibits RhoA and cellular transformation by Lbc RhoGEF via its BCH domain. *J. Cell Sci.* 121, 1739–1749. doi: 10.1242/jcs.021774
- Song, Y., Kirkpatrick, L. L., Schilling, A. B., Helseth, D. L., Chabot, N., Keillor, J. W., et al. (2013). Transglutaminase and polyamination of tubulin: posttranslational modification for stabilizing axonal microtubules. *Neuron* 78, 109–123. doi: 10.1016/j.neuron.2013.01.036
- Sousa, V. L., Bellani, S., Giannandrea, M., Yousuf, M., Valtorta, F., Meldolesi, J., et al. (2009). α -synuclein and its A30P mutant affect actin cytoskeletal structure and dynamics. *Mol. Biol. Cell* 20, 3725–3739. doi: 10.1091/mbc.e08-03-0302
- Su, K.-Y., Chien, W.-L., Fu, W.-M., Yu, L.-S., Huang, H.-P., Huang, P.-H., et al. (2007). Mice deficient in collapsin response mediator protein-1 exhibit impaired long-term potentiation and impaired spatial learning and memory. *J. Neurosci.* 27, 2513–2524. doi: 10.1523/JNEUROSCI.4497-06.2007
- Takei, Y., Kikkawa, Y. S., Atapour, N., Hensch, T. K., and Hirokawa, N. (2015). Defects in synaptic plasticity, reduced NMDA-receptor transport, and instability of postsynaptic density proteins in mice lacking microtubule-associated protein 1A. *J. Neurosci.* 35, 15539–15554. doi: 10.1523/JNEUROSCI.2671-15.2015
- Takei, Y., Kondo, S., Harada, A., Inomata, S., Noda, T., and Hirokawa, N. (1997). Delayed development of nervous system in mice homozygous for disrupted microtubule-associated protein 1B (MAP1B) gene. *J. Cell Biol.* 137, 1615–1626. doi: 10.1083/jcb.137.7.1615
- Takei, Y., Teng, J., Harada, A., and Hirokawa, N. (2000). Defects in axonal elongation and neuronal migration in mice with disrupted tau and map1b genes. *J. Cell Biol.* 150, 989–1000. doi: 10.1083/jcb.150.5.989
- Talbot, K., Cho, D.-S., Ong, W.-Y., Benson, M. A., Han, L.-Y., Kazi, H. A., et al. (2006). Dysbindin-1 is a synaptic and microtubular protein that binds brain snapin. *Hum. Mol. Genet.* 15, 3041–3054. doi: 10.1093/hmg/ddl246
- Tan, M., Cha, C., Ye, Y., Zhang, J., Li, S., Wu, F., et al. (2015). CRMP4 and CRMP2 interact to coordinate cytoskeleton dynamics, regulating growth cone development and axon elongation. *Neural Plast.* 2015:947423. doi: 10.1155/2015/947423
- Taya, S., Shinoda, T., Tsuboi, D., Asaki, J., Nagai, K., Hikita, T., et al. (2007). DISC1 regulates the transport of the NUDEL/LIS1/14-3-3epsikon complex through kinesin-1. *J. Neurosci.* 27, 15–26. doi: 10.1523/JNEUROSCI.3826-06.2006
- Teng, J., Takei, Y., Harada, A., Nakata, T., Chen, J., and Hirokawa, N. (2001). Synergistic effects of MAP2 and MAP1B knockout in neuronal migration, dendritic outgrowth, and microtubule organization. *J. Cell Biol.* 155, 65–76. doi: 10.1083/jcb.200106025
- Ti, S.-C., Alushin, G. M., and Kapoor, T. M. (2018). Human β -tubulin isoforms can regulate microtubule protofilament number and stability. *Dev. Cell* 47, 175.e5–190.e5. doi: 10.1016/j.devcel.2018.08.014
- Tortosa, E., Adolfs, Y., Fukata, M., Pasterkamp, R. J., Kapitein, L. C., and Hoogenraad, C. C. (2017). Dynamic palmitoylation targets MAP6 to the axon to promote microtubule stabilization during neuronal polarization. *Neuron* 94, 809.e7–825.e7. doi: 10.1016/j.neuron.2017.04.042
- Tortosa, E., Galjart, N., Avila, J., and Sayas, C. L. (2013). MAP1B regulates microtubule dynamics by sequestering EB1/3 in the cytosol of developing neuronal cells. *EMBO J.* 32, 1293–1306. doi: 10.1038/emboj.2013.76
- Tortosa, E., Montenegro-Venegas, C., Benoist, M., Härtel, S., González-Billault, C., Esteban, J. A., et al. (2011). Microtubule-associated protein 1B (MAP1B) is required for dendritic spine development and synaptic maturation. *J. Biol. Chem.* 286, 40638–40648. doi: 10.1074/jbc.M111.271320
- Toyoshima, M., Jiang, X., Ogawa, T., Ohnishi, T., Yoshihara, S., Balan, S., et al. (2019). Enhanced carbonyl stress induces irreversible multimerization of CRMP2 in schizophrenia pathogenesis. *Life Sci. Alliance* 2:e201900478. doi: 10.26508/lsa.201900478
- Tsutiya, A., Nishihara, M., Goshima, Y., and Ohtani-Kaneko, R. (2015). Mouse pups lacking collapsin response mediator protein 4 manifest impaired olfactory function and hyperactivity in the olfactory bulb. *Eur. J. Neurosci.* 42, 2335–2345. doi: 10.1111/ejn.12999
- Tsutiya, A., Watanabe, H., Nakano, Y., Nishihara, M., Goshima, Y., and Ohtani-Kaneko, R. (2016). Deletion of collapsin response mediator protein 4 results in abnormal layer thickness and elongation of mitral cell apical dendrites in the neonatal olfactory bulb. *J. Anat.* 228, 792–804. doi: 10.1111/joa.12434
- Uchida, Y., Ohshima, T., Sasaki, Y., Suzuki, H., Yanai, S., Yamashita, N., et al. (2005). Semaphorin3A signalling is mediated via sequential Cdk5 and GSK3 β phosphorylation of CRMP2: implication of common phosphorylation mechanism underlying axon guidance and Alzheimer's disease. *Genes Cells* 10, 165–179. doi: 10.1111/j.1365-2443.2005.00827.x
- Ujike, H., Sakai, A., Nakata, K., Tanaka, Y., Kodaka, T., Okahisa, Y., et al. (2006). Association study of the dihydropyrimidinase-related protein 2 gene and methamphetamine psychosis. *Ann. N Y Acad. Sci.* 1074, 90–96. doi: 10.1196/annals.1369.008
- Valenstein, M. L., and Roll-Mecak, A. (2016). Graded control of microtubule severing by tubulin glutamylation. *Cell* 164, 911–921. doi: 10.1016/j.cell.2016.01.019

- Valenzuela, A., Meservey, L., Nguyen, H., and Fu, M. M. (2020). Golgi outposts nucleate microtubules in cells with specialized shapes. *Trends Cell Biol.* 30, 792–804. doi: 10.1016/j.tcb.2020.07.004
- Van Dijk, A., Vulto-van Silhouet, A. T., Cappuyns, E., van der Werf, I. M., Mancini, G. M., Tzschach, A., et al. (2019). Clinical presentation of a complex neurodevelopmental disorder caused by mutations in ADNP. *Biol. Psychiatry* 85, 287–297. doi: 10.1016/j.biopsych.2018.02.1173
- Vandecandelaere, A., Pedrotti, B., Utton, M. A., Calvert, R. A., and Bayley, P. M. (1996). Differences in the regulation of microtubule dynamics by microtubule-associated proteins MAP1B and MAP2. *Cell Motil. Cytoskeleton* 35, 134–146. doi: 10.1002/(SICI)1097-0169(1996)35:2<134::AID-CM6>3.0.CO;2-A
- Vemu, A., Atherton, J., Spector, J. O., Szyk, A., Moores, C. A., and Roll-Mecak, A. (2016). Structure and dynamics of single-isoform recombinant neuronal human tubulin. *J. Biol. Chem.* 291, 12907–12915. doi: 10.1074/jbc.C116.731133
- Vikhreva, P. N., Korobko, E. V., and Korobko, I. V. (2009). Identification of novel proteins, possible interaction partners for guanine nucleotide exchange factor Varp. *Dokl. Biochem. Biophys.* 429, 323–325. doi: 10.1134/S160767290906009X
- Volle, J., Brocard, J., Saoud, M., Gory-Faure, S., Brunelin, J., Andrieux, A., et al. (2013). Reduced expression of STOP/MAP6 in mice leads to cognitive deficits. *Schizophr. Bull.* 39, 969–978. doi: 10.1093/schbul/sbs113
- Walters, G. B., Gustafsson, O., Sveinbjornsson, G., Eiriksdottir, V. K., Agustsdottir, A. B., Jonsdottir, G. A., et al. (2018). MAP1B mutations cause intellectual disability and extensive white matter deficit. *Nat. Commun.* 9:3456. doi: 10.1038/s41467-018-05595-6
- Wang, Q., and Brandon, N. J. (2011). Regulation of the cytoskeleton by Disrupted-in-schizophrenia 1 (DISC1). *Mol. Cell. Neurosci.* 48, 359–364. doi: 10.1016/j.mcn.2011.06.004
- Webb, B. C., and Wilson, L. (1980). Cold-stable microtubules from brain. *Biochemistry* 19, 1993–2001. doi: 10.1021/bi00550a041
- Wegmann, S., Eftekhariadeh, B., Tepper, K., Zoltowska, K. M., Bennett, R. E., DuJardin, S., et al. (2018). Tau protein liquid-liquid phase separation can initiate tau aggregation. *EMBO J.* 37:e98049. doi: 10.1525/embj.201798049
- Wei, H., Ma, Y., Liu, J., Ding, C., Hu, F., and Yu, L. (2016a). Proteomic analysis of cortical brain tissue from the BTBR mouse model of autism: evidence for changes in STOP and myelin-related proteins. *Neuroscience* 312, 26–34. doi: 10.1016/j.neuroscience.2015.11.003
- Wei, H., Sun, S., Li, Y., and Yu, S. (2016b). Reduced plasma levels of microtubule-associated STOP/MAP6 protein in autistic patients. *Psychiatry Res.* 245, 116–118. doi: 10.1016/j.psychres.2016.08.024
- Wingarten, J., Lassek, M., Mueller, B. F., Rohmer, M., Lungør, L., Baeumlisberger, D., et al. (2014). The proteome of the presynaptic active zone from mouse brain. *Mol. Cell. Neurosci.* 59, 106–118. doi: 10.1016/j.mcn.2014.02.003
- Weingarten, M. D., Lockwood, A. H., Hwo, S. Y., and Kirschner, M. W. (1975). A protein factor essential for microtubule assembly. *Proc. Natl. Acad. Sci. U S A* 72, 1858–1862. doi: 10.1073/pnas.72.5.1858
- Xiao, B., Xu, H., Ye, H., Hu, Q., Chen, Y., and Qiu, W. (2015). De novo 11q13.4q14.3 tetrasomy with uniparental isodisomy for 11q14.3qter. *Am. J. Med. Genet. A* 167A, 2327–2333. doi: 10.1002/ajmg.a.37179
- Xie, R., Nguyen, S., McKeehan, K., Wang, F., McKeehan, W. L., and Liu, L. (2011). Microtubule-associated protein 1S (MAP1S) bridges autophagic components with microtubules and mitochondria to affect autophagosomal biogenesis and degradation. *J. Biol. Chem.* 286, 10367–10377. doi: 10.1074/jbc.M110.206532
- Xu, Z., Schaedel, L., Portran, D., Aguilar, A., Gaillard, J., Marinkovich, M. P., et al. (2017). Microtubules acquire resistance from mechanical breakage through intraluminal acetylation. *Science* 356, 328–332. doi: 10.1126/science.aai8764
- Yadav, S., Verma, P. J., and Panda, D. (2014). C-terminal region of MAP7 domain containing protein 3 (MAP7D3) promotes microtubule polymerization by binding at the C-terminal tail of tubulin. *PLoS One* 9:e95539. doi: 10.1371/journal.pone.0099539
- Yamane, M., Yamashita, N., Hida, T., Kamiya, Y., Nakamura, F., Kolattukudy, P., et al. (2017). A functional coupling between CRMP1 and Nav1.7 for retrograde propagation of Semaphorin3A signaling. *J. Cell Sci.* 130, 1393–1403. doi: 10.1242/jcs.199737
- Yamashita, N., and Goshima, Y. (2012). Collapsin response mediator proteins regulate neuronal development and plasticity by switching their phosphorylation status. *Mol. Neurobiol.* 45, 234–246. doi: 10.1007/s12035-012-8242-4
- Yamashita, N., Morita, A., Uchida, Y., Nakamura, F., Usui, H., Ohshima, T., et al. (2007). Regulation of spine development by semaphorin3A through cyclin-dependent kinase 5 phosphorylation of collapsin response mediator protein 1. *J. Neurosci.* 27, 12546–12554. doi: 10.1523/JNEUROSCI.3463-07.2007
- Yamashita, N., Mosinger, B., Roy, A., Miyazaki, M., Ugajin, K., Nakamura, F., et al. (2011). CRMP5 (collapsin response mediator protein 5) regulates dendritic development and synaptic plasticity in the cerebellar Purkinje cells. *J. Neurosci.* 31, 1773–1779. doi: 10.1523/JNEUROSCI.5337-10.2011
- Yamashita, N., Takahashi, A., Takao, K., Yamamoto, T., Kolattukudy, P., Miyakawa, T., et al. (2013). Mice lacking collapsin response mediator protein 1 manifest hyperactivity, impaired learning and memory, and impaired prepulse inhibition. *Front. Behav. Neurosci.* 7:216. doi: 10.3389/fnbeh.2013.00216
- Yamashita, N., Uchida, Y., Ohshima, T., Hirai, S. I., Nakamura, F., Taniguchi, M., et al. (2006). Collapsin response mediator protein 1 mediates reelin signaling in cortical neuronal migration. *J. Neurosci.* 26, 13357–13362. doi: 10.1523/JNEUROSCI.4276-06.2006
- Yamazaki, Y., Nagai, J., Akinaga, S., Koga, Y., Hasegawa, M., Takahashi, M., et al. (2020). Phosphorylation of CRMP2 is required for migration and positioning of Purkinje cells: redundant roles of CRMP1 and CRMP4. *Brain Res.* 1736:146762. doi: 10.1016/j.brainres.2020.146762
- Yang, S. Z., and Wildonger, J. (2020). Golgi outposts locally regulate microtubule orientation in neurons but are not required for the overall polarity of the dendritic cytoskeleton. *Genetics* 215, 435–447. doi: 10.1534/genetics.119.302979
- Yao, L., Liu, Y.-H., Li, X., Ji, Y.-H., Yang, X.-J., Hang, X.-T., et al. (2016). CRMP1 interacted with Spyl during the collapse of growth cones induced by Sema3A and acted on regeneration after sciatic nerve crush. *Mol. Neurobiol.* 53, 879–893. doi: 10.1007/s12035-014-9049-2
- Yoshimura, T., Kawano, Y., Arimura, N., Kawabata, S., Kikuchi, A., and Kaibuchi, K. (2005). GSK-3 β regulates phosphorylation of CRMP-2 and neuronal polarity. *Cell* 120, 137–149. doi: 10.1016/j.cel.2004.11.012
- Yu-Kemp, H.-C., and Briher, W. M. (2016). Ccollapsin response mediator protein-1 regulates Arp2/3-dependent actin assembly. *J. Biol. Chem.* 291, 658–664. doi: 10.1074/jbc.C115.689265
- Yu-Kemp, H.-C., Kemp, J. P. Jr., and Briher, W. M. (2017). CRMP-1 enhances EVL-mediated actin elongation to build lamellipodia and the actin cortex. *J. Cell Biol.* 216, 2463–2479. doi: 10.1083/jcb.201606084
- Zervas, M., Opitz, T., Edelmann, W., Wainer, B., Kucherlapati, R., and Stanton, P. K. (2005). Impaired hippocampal long-term potentiation in microtubule-associated protein 1B-deficient mice. *J. Neurosci. Res.* 82, 83–92. doi: 10.1002/jnr.20624
- Zhao, Z., Xu, J., Chen, J., Kim, S., Reimers, M., Bacanu, S. A., et al. (2015). Transcriptome sequencing and genome-wide association analyses reveal lysosomal function and actin cytoskeleton remodeling in schizophrenia and bipolar disorder. *Mol. Psychiatry* 20, 563–572. doi: 10.1038/mp.2014.82
- Zheng, Y., Sethi, R., Mangala, L. S., Taylor, C., Goldsmith, J., Wang, M., et al. (2018). Tuning microtubule dynamics to enhance cancer therapy by modulating FER-mediated CRMP2 phosphorylation. *Nat. Commun.* 9:476. doi: 10.1038/s41467-017-02811-7

Conflict of Interest: The authors declare that the research was conducted in the absence of any commercial or financial relationships that could be construed as a potential conflict of interest.

Copyright © 2021 Cuveillier, Boulan, Ravanello, Denarier, Deloume, Gory-Fauré, Deplan, Bosc, Arnal and Andrieux. This is an open-access article distributed under the terms of the Creative Commons Attribution License (CC BY). The use, distribution or reproduction in other forums is permitted, provided the original author(s) and the copyright owner(s) are credited and that the original publication in this journal is cited, in accordance with accepted academic practice. No use, distribution or reproduction is permitted which does not comply with these terms.

