

Université de Montréal

Étude du rôle respectif de MAP2b et MAP2c
dans l'initiation et l'élongation des neurites

Par

Sylvie Cornibert

Programme de biologie moléculaire

Faculté des études supérieures

Mémoire présenté à la Faculté des études supérieures
en vue de l'obtention du grade de
Maître ès sciences (M.Sc.)
en biologie moléculaire

Mai, 2000

©Sylvie Cornibert, 2000



E 2017-1112

1. Einleitung

Das Ziel der vorliegenden Arbeit ist es, die

QH
506
U54
2000
N. 011

2. Grundlagen

3. Ergebnisse

4. Diskussion

5. Zusammenfassung

6. Literaturverzeichnis

7. Anhang

8. Schluss



Université de Montréal
Faculté des études supérieures

Ce mémoire intitulé :

Étude du rôle respectif de MAP2b et de MAP2c
dans l'initiation et l'élongation des neurites

présenté par :

Sylvie Cornibert

a été évalué par un jury composé des personnes suivantes :

Dr. Luc Desgroseillers

Dr. Nicole Leclerc

Dr. Laurent Descarries

Mémoire accepté le

SOMMAIRE

Au cours du développement du système nerveux, la protéine associée aux microtubules MAP2 serait impliquée dans la formation des neurites mineures et dans la spécification du compartiment somato-dendritique du neurone. Il existe plusieurs isoformes de MAP2 dont l'expression est régulée par épissage alternatif. Les deux isoformes les mieux caractérisées sont MAP2b et MAP2c. MAP2c, l'isoforme juvénile de faible poids moléculaire, est exprimée dans les neurites mineures et les dendrites au cours du développement embryonnaire et son expression diminue progressivement au cours du développement pour disparaître chez l'adulte. L'isoforme adulte MAP2b de haut poids moléculaire est exprimée dans les neurites mineures et les dendrites durant le développement et la vie adulte du neurone.

Les études de fonction de MAP2 ont permis d'impliquer MAP2b et MAP2c dans la neuritogénèse. L'inhibition de l'expression de MAP2 dans des cellules neuronales par une approche antisens ne permet pas de distinguer les effets des différentes isoformes de MAP2 car ils contiennent une séquence identique en 5' de leurs ARNm. Lorsque cette approche a été utilisée sur des cultures primaires de neurones de l'hippocampe, ces neurones n'ont élaboré aucune neurite. L'utilisation de l'approche antisens sur les cellules de la lignée EC P19 a également généré des cellules n'élaborant aucune neurite et qui continuaient même à se diviser. L'expression des deux isoformes MAP2b et MAP2c dans les cellules ovariennes d'insecte Sf9 à l'aide du baculovirus induit la production de prolongements cytoplasmiques. MAP2c induit la majorité des cellules à élaborer des prolongements multiples ressemblants à des neurites mineures et MAP2b induit seulement 20 % des cellules à élaborer des prolongements ressemblant à des dendrites. Les cellules Sf9 ont permis d'étudier l'implication des divers domaines de MAP2 dans la formation des prolongements cytoplasmiques. Notre laboratoire a ainsi pu démontrer que le domaine de liaison aux microtubules est suffisant pour induire la formation de prolongements.

Nous nous sommes intéressés ici à la fonction du domaine de projection de MAP2. Pour étudier le rôle des domaines de projection de MAP2b et MAP2c dans la neuritogénèse, nous avons produit des formes mutantes de MAP2 correspondant à divers domaines de la protéine. On pouvait supposer que la co-expression de ces mutants avec les protéines complètes permettrait de détecter la fonction particulière du domaine de projection. La protéine tronquée agirait comme un mutant dominant négatif de MAP2 en découplant ses domaines fonctionnels. En surexprimant le domaine de projection spécifique à MAP2b, on espérait perturber spécifiquement la MAP2b endogène, tandis qu'en surexprimant le domaine de projection de MAP2c, on s'attendait à perturber la MAP2c endogène.

Nous avons d'abord vérifié, dans les cellules Sf9, le comportement des mutants de MAP2 que nous avons produits. Nous avons co-exprimé les mutants et les protéines complètes pour vérifier si la surexpression des mutants pouvait modifier le phénotype induit par MAP2b et MAP2c. Le domaine de projection de MAP2c et le domaine de liaison aux microtubules ont induit, dans les cellules exprimant MAP2c, une baisse de leur capacité à élaborer des prolongements. Le domaine de liaison aux microtubules de MAP2 a induit, dans les cellules exprimant MAP2b, une augmentation de leur capacité à élaborer des prolongements. Seul le domaine de projection de MAP2b n'a pas induit de modification significative du phénotype cellulaire induit par MAP2b.

Nous avons ensuite essayé d'exprimer nos constructions dans les cellules EC P19, un modèle de différenciation neuronale. Nous avons introduit par transfection l'ADN codant pour les protéines tronquées dans les cellules EC P19, puis nous avons induit la différenciation de ces cellules avec l'acide rétinoïque. Les cellules transfectées avec les domaines fonctionnels de MAP2c n'ont produit aucun prolongement neuritique et semblaient continuer à se diviser. Ces premiers résultats impliqueraient MAP2c dans l'initiation de la formation des neurites et dans la sortie du cycle cellulaire des neurones.

TABLE DES MATIÈRES

Sommaire	iii
Table des matières	v
Liste des figures	viii
Liste des sigles et abréviations	x
Remerciements	xi
INTRODUCTION	1
1. La différenciation neuronale	2
1.1. Acquisition de l'identité neuronale	2
1.2. Sortie du cycle cellulaire et différenciation	2
1.2.1. Le contrôle du cycle cellulaire	2
1.2.2. Différenciation neuronale	3
2. Le cytosquelette	7
2.1. Les différentes composantes du cytosquelette	7
2.1.1. Les filaments	7
2.1.2. Les protéines associées aux filaments	8
2.2. Le cytosquelette dans les maladies neurodégénératives	11
3. MAP2	12
3.1. Les différentes isoformes de MAP2	12
3.2. Distribution et structure de MAP2b et MAP2c	13
3.2.1. Distribution spatio-temporelle des isoformes	13
3.2.2. Analyse moléculaire et phosphorylation de MAP2b et MAP2c	16
4. Les études de fonction de MAP2	19
4.1. Études de perte de fonction	19
4.2. Études de gain de fonction	21
5. Approche expérimentale	22
5.1. Le modèle Sf9	22

5.2. Le modèle EC P19	23
5.3. L'effet dominant négatif	25
6. Objectif de ce travail	26
MATÉRIEL ET MÉTHODES	27
1. Biologie moléculaire	27
1.1. Digestion enzymatique	27
1.2. Réaction en chaîne à la polymérase (PCR)	27
1.3. Ligation	28
1.4. Transformation	28
1.5. Minipréparation d'ADN (lyse alcaline)	29
1.6. Maxi-préparation d'ADN	29
1.7. Séquençage	30
2. Construction des mutants	31
2.1. MAP2b complète	31
2.2. MAP2c complète	43
2.3. Prob	43
2.4. Proc	44
2.5. Mt	44
2.6. Transfert des constructions au vecteur d'expression eucaryote	45
3. Expression des mutants	45
3.1. Cultures cellulaires	45
3.2. Infection par le baculovirus	47
3.3. Transfection des cellules EC P19	47
3.4. Immunofluorescence	48
3.5. Immunobuvardage	49
3.6. Analyse morphologique	50
RÉSULTATS	51
1. Construction des mutants	51
2. Vérification du comportement des mutants	54

2.1. Infections simples des cellules Sf9	54
2.2. Effet dominant négatif	59
2.2.1. Co-infection MAP2b/Mt	60
2.2.2. Co-infection MAP2b/Prob	61
2.2.3. Co-infection MAP2c/Mt	66
2.2.4. Co-infection MAP2c/Proc	67
2.3. Spécificité des domaines de MAP2	73
2.4. Coopérativité des domaines de MAP2	77
3. Transfert des constructions au vecteur d'expression eucaryote	79
4. Expression des constructions de MAP2 dans le système EC P19	79
4.1. Mise au point de la co-transfection avec la GFP	80
4.2. Co-transfection des constructions de MAP2 dans le système neuronal EC P19	81
4.2.1. Cellules non-induites	84
4.2.2. Cellules induites fixées à deux jours de différenciation	88
4.2.3. Cellules induites fixées à cinq jours de différenciation	93
 DISCUSSION ET CONCLUSIONS	 97
Considérations méthodologiques	97
1. Comportement dominant négatif des constructions	99
2. MAP2c serait impliquée dans la neuritogénèse des neurones issus des cellules EC P19	101
3. Une protéine MAP2c fonctionnelle serait nécessaire à la sortie du cycle cellulaire des neurones issus des cellules EC P19	106
4. Directions futures	109
 BIBLIOGRAPHIE	 111

LISTE DES FIGURES

Figure 1 : Illustration des stades de la différenciation du neurone de l'hippocampe.	5
Figure 2 : Structure moléculaire de la protéine MAP2.	14
Figure 3 : Vecteurs utilisés pour générer les constructions de MAP2 dans les cellules Sf9 et les cellules EC P19.	32
Figure 4 : Stratégies de clonage des constructions de MAP2.	35
Figure 5 : Constructions exprimées dans les cellules Sf9 et les cellules EC P19.	52
Figure 6 : Patterns de production de prolongements induits par l'infection simple avec les constructions de MAP2 dans les cellules Sf9.	55
Figure 7 : Micrographies illustrant les patterns de production de prolongements cytoplasmiques induits par l'expression, dans les cellules Sf9, des protéines MAP2b et MAP2c ou de leurs différents domaines fonctionnels.	57
Figure 8 : Comportement dominant négatif des constructions Prob et Mt dans les cellules Sf9.	62
Figure 9 : Micrographies illustrant l'effet dominant négatif des domaines Prob et Mt sur MAP2b obtenu par co-infection des cellules Sf9.	64
Figure 10 : Comportement dominant négatif des constructions Proc et Mt dans les cellules Sf9.	68

- Figure 11 : Micrographies illustrant l'effet dominant négatif des domaines Proc et Mt sur MAP2c obtenu par co-infection des cellules Sf9. 70
- Figure 12 : Quantification des co-infections pour vérifier la spécificité et la coopérativité des différents domaines de MAP2 dans les cellules Sf9. 74
- Figure 13 : Micrographies illustrant le phénotype des cellules contrôles EC P19. 82
- Figure 14 : Quantification du phénotype obtenu dans les cellules EC P19 après deux jours de différenciation. 85
- Figure 15 : Micrographies illustrant la différenciation neuronale des cellules EC P19 transfectées avec les diverses constructions de MAP2. 89
- Figure 16 : Analyse des dendrites des neurones issus des cellules EC P19 après cinq jours de différenciation. 94

LISTE DES SIGLES ET ABRÉVIATIONS

ABP	actin-binding protein
ADN	acide désoxyribonucléique
ADNc	acide désoxyribonucléique complémentaire
AMPC kinase	kinase dépendante de l'AMPc de type II
ARNm	acide ribonucléique messenger
CaM kinase	kinase dépendante de la Ca ²⁺ /calmoduline
Cdk	kinase cdc2-like
CKI	Cdk inhibitor
EC P19	carcinome embryonnaire P19
kb	kilo base
kDa	kilo Dalton
MAP	microtubule-associated protein
MAPKinase	mitogen-activated protein kinase
MOI	multiplicités d'infection
NF-H, NF-M et NF-L	sous-unités lourde, moyenne et légère des neurofilaments
pb	paire de base
PC12	adrenal pheochromocytoma
PCR	réaction en chaîne à la polymérase
PHFs	filaments pairés en hélice
Sf9	Spodoptera frugiperda
SLA	sclérose latérale amyotrophique

REMERCIEMENTS

Je tiens à remercier mon directeur de recherche Nicole Leclerc pour son support et pour son aide tout au long de cette maîtrise. Je la remercie de la patience dont elle a su faire preuve à mon égard. J'aimerais également remercier Dave Bélanger et Guillaume Lesage pour leur aide et leurs bons conseils lors du clonage des constructions. Finalement j'aimerais remercier mes parents pour leur support psychologique et parfois financier durant ma maîtrise.

INTRODUCTION

Au cours du développement embryonnaire, les neurones élaborent deux types de prolongements distincts, les dendrites et l'axone. La polarité cellulaire établie par ces deux compartiments permet aux neurones de constituer des réseaux complexes pour transmettre les influx électriques d'une cellule à l'autre. Les dendrites permettent de transmettre les influx vers le corps cellulaire et l'axone les transmet vers une autre cellule. L'élaboration de ces prolongements spécialisés nécessite une réorganisation du cytosquelette neuronal sous le contrôle de facteurs extrinsèques et intrinsèques. Nous nous intéressons à l'implication du facteur intrinsèque MAP2 (microtubule-associated protein 2) dans la formation des prolongements neuronaux, la neuritogénèse. MAP2 est fortement associée aux microtubules dans les neurones et son affinité pour les microtubules est modulée par son état de phosphorylation. Plusieurs kinases impliquées dans les voies de signalisation intracellulaire peuvent phosphoryler MAP2. Celle-ci pourrait donc permettre de lier le cytosquelette aux signaux extrinsèques par le biais des voies de signalisation intracellulaire.

Il existe plusieurs isoformes de MAP2 dont l'expression est régulée au cours du développement. Nous nous intéressons plus particulièrement au rôle des isoformes MAP2b et MAP2c, les mieux caractérisées, dans la différenciation neuronale.

1. La différenciation neuronale :

1.1. Acquisition de l'identité neuronale :

Les neurones sont des cellules post-mitotiques polaires possédant de longs prolongements avec une identité axonale ou dendritique. Les neurones sont issus de cellules rondes non-différenciées, les précurseurs neuronaux. Ces précurseurs neuronaux expriment des gènes de spécification neuronale, les gènes proneuronaux, tel le complexe de gènes achaete-scute chez la drosophile ou les gènes Neurogénine1 à 3 chez la souris. Le précurseur neuronal est ensuite déterminé en neuroblaste par l'activation de gènes neurogéniques telle la cascade d'interaction entre les protéines Notch et Delta chez la drosophile ou leurs homologues Notch1 à 4 et Delta1 à 3 chez la souris (Gilbert, 1997; Doe et al., 1998; Ma et al., 1998). Une fois déterminé, le neuroblaste va sortir du cycle cellulaire et se différencier en neurone en formant des prolongements cytoplasmiques.

1.2. Sortie du cycle cellulaire et différenciation :

1.2.1. Le contrôle du cycle cellulaire :

La sortie d'une cellule du cycle cellulaire est un phénomène complexe encore peu connu. Le cycle cellulaire d'une cellule est régulé par l'expression cyclique de protéines de la famille des cyclines associées à des kinases, les Cdk. L'activation des complexes cycline/Cdk peut être inhibée par phosphorylation des Cdk ou par la liaison de protéines inhibitrices de la famille des CKI (Cdk inhibitors) au complexe (Cordon-Cardo, 1995). La progression d'une cellule à travers le cycle cellulaire est contrôlée par l'activation des complexes cycline/Cdk spécifiques à chaque phase du cycle. L'activité

kinase des Cdks est dirigée contre une grande variété de protéines dont certaines protéines du cytosquelette. La sortie du cycle cellulaire du neuroblaste peut provoquer sa différenciation en neurone ou sa mort par apoptose (Nagy et al., 1998). Cette sortie est influencée par des facteurs de croissance (neurotrophine-3, PDGF et IGF-1) ou des molécules effectrices, comme l'hormone thyroïdienne ou l'acide rétinoïque, qui peuvent activer les inhibiteurs CKI (Bernal et Nunez, 1995; Temple et Qian, 1995). Le neuroblaste est maintenu dans la phase G₀, en dehors du cycle cellulaire, par l'inhibition du complexe cyclinD/Cdk4,6 par, entre autres, les CKIs p15, p16, p21 et p27. L'activation de ce complexe par des facteurs de croissance mitogéniques provoquerait la réintégration du neurone dans le cycle cellulaire (Cordon-Cardo, 1995; Nagy et al., 1998).

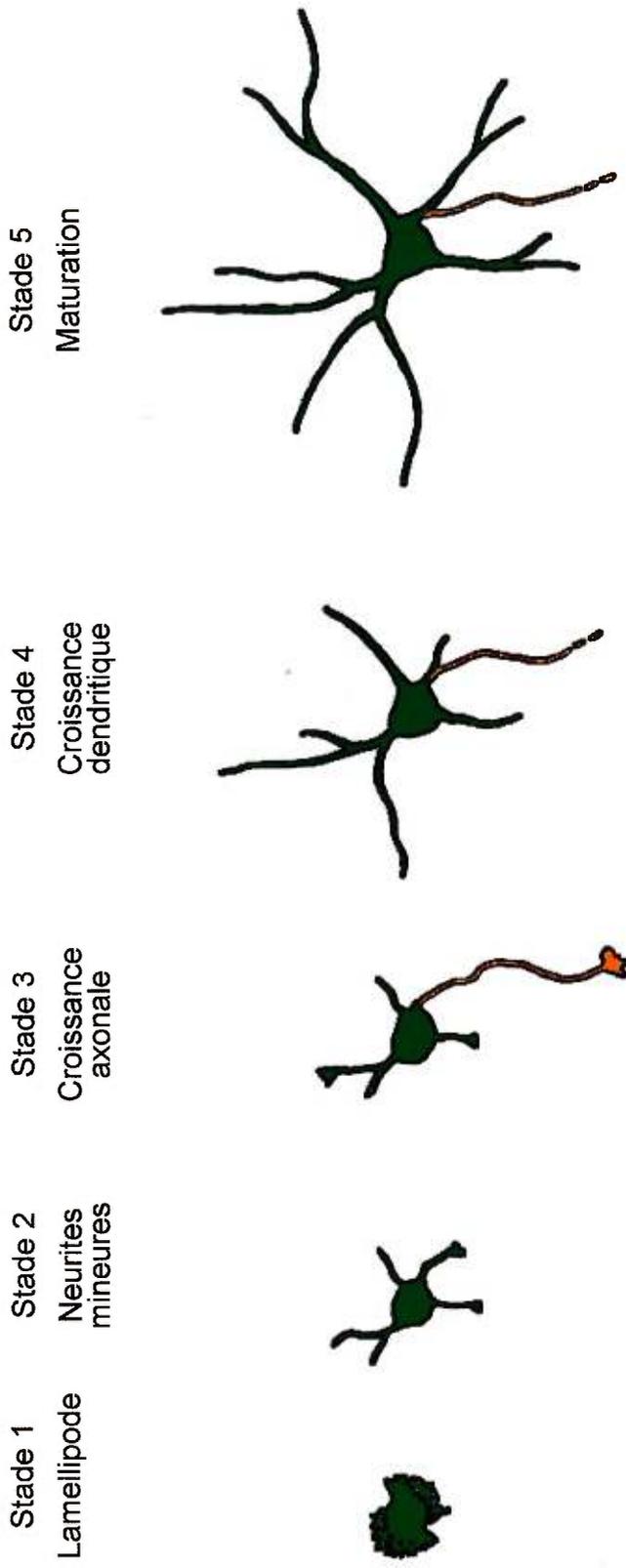
1.2.2. Différenciation neuronale :

Si les kinases Cdk sont responsables du contrôle du cycle cellulaire, la kinase Cdk5 semble plutôt impliquée dans la différenciation neuronale (Lee et al., 1997). Cdk5 est exprimée de façon ubiquiste, mais son expression est maximale dans le cerveau. Elle est capable de se lier à la cycline D1, mais ce complexe ne possède aucune activité. Cdk5 serait plutôt impliquée dans la différenciation neuronale par son association à la protéine régulatrice p35^{nck5a} pour former le complexe Nck (Neuronal Cdc2-like kinase) (Lee et al., 1997). La protéine p35, spécifiquement neuronale, peut être clivée pour donner une protéine de 25 kDa hyperactive, laquelle pourrait être impliquée dans la maladie d'Alzheimer (Patrick et al., 1999). On retrouve Nck dans les neurones du système nerveux central où l'on a montré qu'il peut phosphoryler la MAP tau, les neurofilaments et la synapsine I (Lew et Wang, 1995; Matsubara et al., 1996). Dans le

cerveau embryonnaire, son activité kinase est associée avec la différenciation neuronale (Lee et al., 1997). Le neurone se différencie *in vitro* en suivant des étapes précises. Au début de la différenciation, le neurone développe un lamellipode d'actine qui se consolide pour former des prolongements cytoplasmiques à l'identité encore indéterminée appelées neurites mineures. Une de ces neurites mineures va s'allonger plus rapidement que les autres et devenir l'axone. Les autres neurites vont se différencier en dendrites. On obtient ainsi, dans le neurone mature, trois compartiments distincts : le corps cellulaire ou soma, l'axone et les dendrites (cf. Figure 1).

La formation des prolongements neuritiques implique une réorganisation majeure du cytosquelette du neurone. La formation de ces prolongements peut se diviser en trois étapes : l'initiation du prolongement, son élongation et sa stabilisation (Mitchison et Kirschner, 1988). L'initiation d'un prolongement se fait par l'élaboration d'un réseau complexe d'actine pour permettre d'orienter les microtubules lors de l'élongation. Les microtubules sont ensuite reliés en faisceaux pour être stabilisés dans la direction de l'élongation. La croissance d'une neurite se fait par la présence d'un cône de croissance à son extrémité. Ce cône de croissance est une structure dans laquelle le réseau d'actine interagit avec les microtubules pour les aligner et permettre l'élongation du prolongement. La formation d'un prolongement neuronal demande donc la coopération des microtubules et des microfilaments du cytosquelette du neurone (Mitchison et Kirschner, 1988; Tanaka et Sabry, 1995). La réorganisation du cytosquelette nécessaire à la formation des neurites pourrait être sous le contrôle des voies de signalisation intracellulaire via les protéines de la famille des Rho GTPases. L'activation de ces intégrateurs des voies de signalisation intracellulaire favorise la polymérisation de

Figure 1: Illustration des stades de différenciation du neurone de l'hippocampe. Le neurone de l'hippocampe se différencie en suivant des étapes bien caractérisées. La présence de la protéine MAP2 est représentée en vert et celle de la MAP tau dans l'axone en orange. Modifié de Banker, G. and K. Goslin. 1990. *Culturing Nerve Cells*. C. F. Stevens, editor, Cambridge, Massachussetts. p.357



 MAP2
 Tau

l'actine et la croissance neuritique (Malosio et al., 1997; Threadgill et al., 1997; Hall, 1998). Les Rho GTPases serviraient à lier les récepteurs membranaires au cytosquelette d'actine.

2. Le cytosquelette :

2.1. Les différentes composantes du cytosquelette :

Le cytosquelette est un ensemble de réseaux protéiques tridimensionnels responsable du maintien de la forme, de la mobilité et du transport de vésicules et d'organelles à l'intérieur de la cellule. Le cytosquelette se compose de filaments et de protéines qui leur sont associées.

2.1.1. Les filaments :

Le cytosquelette est composé de trois types de filaments protéiques classés selon la taille de leur diamètre. Les microfilaments d'actine, d'un diamètre de 5 à 7 nm, sont constitués de monomères d'actine-G assemblés en longs filaments polarisés. Il existe six isoformes majeures d'actine dont le pattern d'expression dépend du type cellulaire (Bershadsky et Vasiliev, 1988). Seulement deux de ces isoformes, les isoformes β et γ non-musculaires, sont exprimées dans les cellules nerveuses. Les microfilaments d'actine sont le principal constituant du dense réseau cortical situé directement sous la membrane plasmique des cellules, le cortex cellulaire. Les microtubules sont les plus gros des filaments du cytosquelette avec un diamètre de 25 nm. Ils sont constitués par l'assemblage des protéines α -tubuline et β -tubuline en protofilaments. Treize protofilaments sont nécessaires pour former un microtubule polaire (Bershadsky et

Vasiliev, 1988). Les microtubules ont surtout un rôle architectural important au niveau de l'élaboration et du maintien de la morphologie cellulaire et sont également impliqués dans le transport intracellulaire. Les filaments intermédiaires, dont le diamètre varie entre 10 et 12 nm, constituent la troisième classe de filaments du cytosquelette. Ces filaments sont formés par l'assemblage d'une ou plusieurs protéines provenant de cinq classes différentes de sous-unités : vimentine, protéine acide fibrillaire gliale (GFAP), desmine, neurofilaments et kératines. Cette grande variabilité dans la composition est régulée par un contrôle spatio-temporel de l'expression des différentes sous-unités ce qui fait des filaments intermédiaires un bon marqueur de la différenciation cellulaire (Bershadsky et Vasiliev, 1988). Le principal rôle connu des filaments intermédiaires est de conférer aux cellules une résistance au stress mécanique. Les filaments intermédiaires que l'on retrouve dans les neurones sont les neurofilaments constitués par l'assemblage des trois sous-unités NF-H, NF-M et NF-L. Les microtubules et les microfilaments d'actine du cytosquelette sont des structures polaires qui se polymérisent plus rapidement à une de leurs extrémités qu'à l'autre.

2.1.2. Les protéines associées aux filaments :

a) Les protéines de liaison à l'actine :

Les protéines de liaison à l'actine (ABPs) sont capables, comme leur nom l'indique, de lier fortement les filaments d'actine. Elles permettent, en liant ensemble plusieurs protéines d'actine monomérique, de diminuer la masse critique d'actine nécessaire à son assemblage en microfilaments. En plus de favoriser la formation des microfilaments, certaines ABPs permettent également à ceux-ci de former des faisceaux ou des réseaux complexes (ex. : ABP-280 et α -actine). Les ABPs sont également

responsables de la stabilisation des filaments (ex : tropomyosine) et de leur liaison à la membrane plasmique de la cellule (ex : spectrine) (Bershadsky et Vasiliev, 1988). La présence des protéines de liaison à l'actine permet de relier le cytosquelette d'actine à la machinerie de signalisation intracellulaire pour permettre sa modification en réponse à des stimuli internes ou externes.

b) Les protéines de liaison aux microtubules :

Les protéines associées aux microtubules (MAPs) sont des protéines thermostables fortement associées aux microtubules. On peut distinguer deux types de MAPs, les MAPs motrices et les MAPs structurales. Les MAPs motrices, comme les kinésines et les dynéines, sont impliquées dans le transport antérograde et rétrograde des composantes cellulaires le long des microtubules (Hirokawa, 1998). Nous nous concentrerons sur les MAPs structurales. Celles-ci favorisent l'assemblage des microtubules en réduisant la concentration de tubuline nécessaire à sa polymérisation et stabilisent les microtubules déjà formés en réduisant l'instabilité dynamique (Olmsted, 1991). La régulation de l'activité des MAPs se fait, entre autres, via leur pattern d'expression et via des modifications post-traductionnelles de phosphorylation. Certaines MAPs sont exprimées spécifiquement dans certains tissus, tels MAP1B, MAP2 et tau qui sont exprimées spécifiquement dans le système nerveux central et périphérique, alors que MAP4 est exprimée de façon ubiquiste dans l'ensemble des cellules de l'organisme. Tau est exprimée uniquement dans l'axone des neurones en cours de développement et durant la vie adulte. Elle aurait un rôle dans la spécification du compartiment axonal et dans le maintien de la structure de ce prolongement chez l'adulte. MAP2 est exprimée dans les neurones en développement et son expression est

restreinte au compartiment dendritique chez l'adulte (Tucker, 1990) (voir section 3.). Les MAPs possèdent deux domaines fonctionnels, un domaine de liaison aux microtubules et un domaine de projection qui fait saillie à la surface du microtubule. Les MAPs MAP2, MAP4 et tau ont une structure très similaire avec leur domaine de liaison aux microtubules en C-terminal. L'affinité de ce domaine pour les microtubules est médiée par trois à quatre séquences fortement conservées de 18 acides aminés (Tucker, 1990; Olmsted, 1991; Tokuraku et al., 1999). MAP1B, aussi appelé MAP1.2 et MAP5, a par contre une structure très différente avec son domaine de liaison aux microtubules en N-terminal. MAP1B ne contient pas non plus les séquences répétées de 18 acides aminés responsables de la liaison aux microtubules des autres MAPs, mais plutôt deux régions fortement basiques contenant des répétitions du motif Lys-Lys-Glu-Glu (Tucker, 1990). L'activité des MAPs est également régulée par leur état de phosphorylation. La phosphorylation des MAPs par des protéines kinases contrôle leur conformation et leur charge globale ce qui permet de moduler leur affinité pour les microtubules et les différents autres éléments du cytosquelette (Drewens et al., 1997).

c) Protéines intégratrices du cytosquelette :

Il existe des protéines associées au cytosquelette capable de se lier aux trois types de filaments (Yang et al., 1999). Ces protéines de la famille des plakines ont d'abord été découvertes grâce à leur capacité à se lier aux filaments intermédiaires. Elles permettent de stabiliser les filaments intermédiaires et de les relier aux voies de signalisation intracellulaire et à la membrane plasmique. Certaines plakines peuvent également se lier aux microfilaments d'actine (Yang et al., 1996). La découverte d'un site de liaison aux

microtubules sur ces protéines permet d'envisager une intégration des trois composantes du cytosquelette (Yang et al., 1999).

2.2. Le cytosquelette dans les maladies neurodégénératives :

Le cytosquelette neuronal a été impliqué dans plusieurs maladies neurodégénératives, telles la maladie d'Alzheimer, la maladie de Parkinson et la sclérose latérale amyotrophique (SLA). Un déséquilibre de la quantité relative des différentes sous-unités des neurofilaments (NF-H, NF-M et NF-L) serait à l'origine des problèmes de gonflement axonal observé dans les neurones moteurs des patients atteints de SLA. Un tel déséquilibre provoquerait une accumulation de neurofilaments qui conduirait, à plus ou moins long terme, à la dégénérescence et la mort du neurone (Julien et al., 1998; Julien et Mushynski, 1998).

La maladie d'Alzheimer est caractérisée par la présence dans le cerveau des patients de plaques séniles et d'enchevêtrements neurofibrillaires, ainsi que par une mort neuronale importante. Un problème de contrôle du cycle cellulaire dans les neurones pourrait être à l'origine du développement de la maladie (Nagy et al., 1998). L'activation du cycle cellulaire des neurones provoque la libération de la protéine β -amyloïde qui est un constituant des plaques séniles. La β -amyloïde peut stimuler les MAPKinases capables de phosphoryler tau (Kosik, 1992; Lee, 1995). L'hyperphosphorylation de tau amène son assemblage en filaments pairés en hélice (PHFs), principal constituant des enchevêtrements neurofibrillaires. Une baisse dans l'activité des phosphatases responsables de la déphosphorylation de tau pourrait être également impliquée dans l'accumulation des PHFs (Gong et al., 1993). L'accumulation

des PHFs et des plaques séniles amènerait la dégénérescence du neurone (Kosik, 1992; Lee, 1995; Nagy et al., 1998).

Les corps de Lewy, présents dans certains types de neurones chez les patients atteints de la maladie de Parkinson, sont composés entre autres de MAP5 et parfois de MAP2 (Gai et al., 1996). La présence de ces MAPs dans les corps de Lewy suggère une atteinte du cytosquelette dans la maladie neurodégénérative de Parkinson. Une expression anormale des MAPs MAP2 et MAP5 a aussi été décrite dans les cerveaux de patients souffrant de schizophrénie (Arnold et al., 1991).

3. MAP2 :

3.1. Les différentes isoformes de MAP2 :

Il existe plusieurs isoformes de MAP2 toutes issues du même gène par épissage alternatif. Les quatre principales sont MAP2a, MAP2b, MAP2c et MAP2d. MAP2a et MAP2b, encodées par un ARNm de 9kb, sont les deux isoformes de haut poids moléculaire constituant la forme dite adulte de MAP2 (Garner et Matus, 1988). MAP2b contient 1828 acides aminés et dont le poids moléculaire apparent est de 280 kDa. MAP2a est obtenue par épissage alternatif en insérant 82 acides aminés additionnels entre les acides aminés 147 et 148 de MAP2b (Olmsted, 1991; Kindler et al., 1996). MAP2c est encodé par un ARNm de 6 kb qui génère une protéine de faible poids moléculaire (~70kDa) de 467 acides aminés (Garner et Matus, 1988). Les 1372 acides aminés 147 à 1519 de MAP2b sont éliminés par épissage alternatif du domaine de projection pour produire MAP2c (Papandrikopoulou et al., 1989). L'isoforme MAP2d

est une isoforme de faible poids moléculaire que l'on retrouve de façon enrichie dans les cellules gliales (Richter-Landsberg et Gorath, 1999). Par rapport à MAP2c, MAP2d contient 31 acides aminés additionnels en C-terminal, lesquels introduisent un domaine supplémentaire de liaison aux microtubules (Ferhat et al., 1994) (cf. Figure 2). Il existe également plusieurs autres isoformes de haut poids moléculaires de MAP2, que l'on retrouve dans la moelle épinière (Langkopf et al., 1994; Couchie et al., 1996; Forleo et al., 1996).

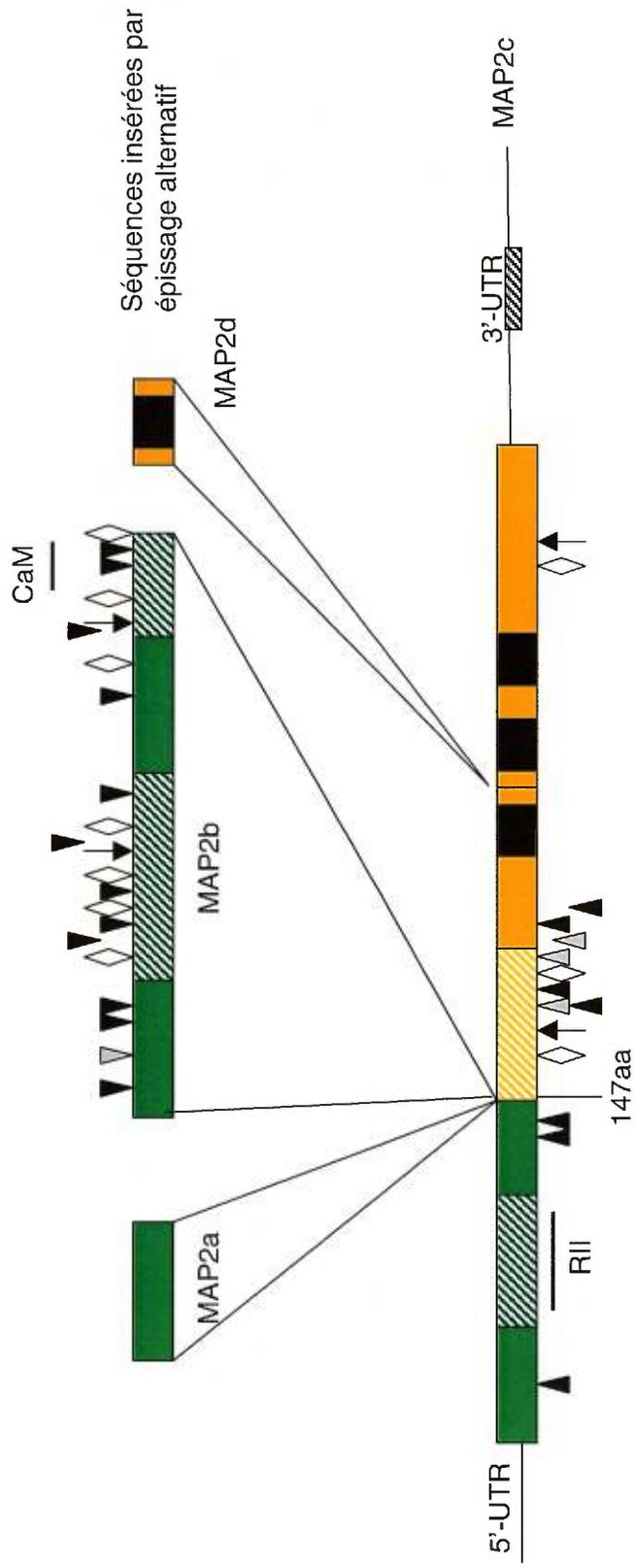
3.2. Distribution et structure de MAP2b et MAP2c :

3.2.1. Distribution spatio-temporelle des isoformes :

Notre étude s'est concentrée sur les deux isoformes MAP2b et MAP2c, car elles sont les mieux caractérisées de toutes les isoformes de MAP2. Bien qu'issues du même gène, ces deux isoformes présentent des patterns d'expression spatio-temporels très différents. MAP2c, l'isoforme juvénile, se retrouve dans le neurone en développement durant les premières étapes de la différenciation et son expression diminue progressivement pour disparaître peu après la naissance lors de la consolidation du réseau neuronal (Tucker, 1990). Dans le cerveau adulte, on ne retrouve la protéine MAP2c que dans des zones spécifiques encore capables de régénération, tel le bulbe olfactif (Viereck et al., 1989). L'isoforme MAP2b est exprimée tout au long de la différenciation et dans le cerveau adulte (Tucker et al., 1988). Si on retrouve les protéines MAP2b et MAP2c dans le soma et les dendrites du neurone en développement (Tucker et al., 1988), on ne retrouve l'ARNm de MAP2c que dans le soma des neurones alors que l'ARNm de MAP2b est transporté dans les dendrites (Papandrikopoulou et al.,

Figure 2 : Structure moléculaire de la protéine MAP2. Les différents domaines fonctionnels de la protéine MAP2 sont illustrés, ainsi que le phénomène d'épissage alternatif qui produit les isoformes MAP2a, MAP2b et MAP2d à partir de MAP2c. Nous avons également illustré les sites potentiels de phosphorylation par les MAPKinases, la Cdk5, la kinase dépendante de la Ca^{2+} /calmoduline (CaM kinase) et la kinase dépendante de l'AMPc. Le signal de ciblage dendritique de MAP2 est représenté dans cette illustration bien qu'il soit situé dans la partie 3' non-codante de l'ARNm de MAP2 et non dans la protéine.

(Kindler et al., 1990, 1996)



-  Domaine de projection de MAP2
 -  Domaine de liaison aux microtubules de MAP2
 -  Région de haute homologie
 -  Séquence de liaison à la tubuline
 -  Signal de ciblage dendritique de l'ARNm
-
-  Séquence consensus de liaison à une protéine
 -  Site potentiel de phosphorylation par les MAPKs
 -  Site potentiel de phosphorylation par la Cdk5
 -  Site potentiel de phosphorylation par la CaM kinase
 -  Site potentiel de phosphorylation par la kinase dépendante de l'AMPC

1989; Marsden et al., 1996). Les ARNm de MAP2b et de MAP2c contiennent une séquence non-traduite de 411 nucléotides en 5' et une séquence non-traduite de 3,74 kb en 3' (Kindler et al., 1996). Un signal de ciblage dendritique de 640 nucléotides a été découvert dans la séquence 3' non-traduite (Blichenberg et al., 1999). La structure secondaire de cette séquence présenterait deux groupes de structures en épingle à cheveux séparés par une longue région double brin. Les régions 5' et 3' non-traduites de l'ARNm étant en apparence identiques pour les deux isoformes MAP2b et MAP2c (Kindler et al., 1996), la présence de ce signal n'explique pas le ciblage spécifique de l'ARNm de MAP2b et non de MAP2c dans les dendrites.

3.2.2. Analyse moléculaire et phosphorylation de MAP2b et MAP2c:

La protéine MAP2 peut être divisée en deux domaines fonctionnels : un domaine de liaison aux microtubules, constitué des 315 acides aminés en C-terminal et qui se lie physiquement aux microtubules, et un domaine de projection en N-terminal qui fait saillie à la surface du microtubule. La séquence de MAP2 est fortement conservée à travers les espèces, avec 92 % d'identité de séquence entre le rat et la souris et 76 % entre le rat et l'humain. Cette identité est concentrée dans quatre régions de la protéine. La première de ces régions se situe entre les acides aminés 1650 et 1800 de MAP2b et comprend les trois séquences homologues en tandem de 18 acides aminés responsables de la liaison aux microtubules. La deuxième de ces séquences a une plus grande capacité de liaison que les autres (Coffey et al., 1994). Les trois sites de liaison permettraient à MAP2 de lier plusieurs microtubules à la fois, ce qui contribuerait à limiter la flexibilité des microtubules et donc à augmenter la rigidité des prolongements neuritiques selon les modèles de Matus (1994) ou de Coffey et al. (1994). Ces sites de liaison seraient

également responsables de l'interaction de MAP2 avec les microfilaments (Correas et al., 1990), malgré leur peu de similarité avec les séquences consensus de liaison à l'actine. La deuxième région d'identité de séquence se situe entre les acides aminés 75 et 125 de MAP2b et de MAP2c et contient un site de liaison pour la sous-unité régulatrice de la kinase dépendante de l'AMPc. Les deux autres régions sont situées entre les acides aminés 650 et 940 et entre les acides aminés 1370 et 1650 de MAP2b (Kindler et al., 1990). Le domaine de projection de MAP2 est une structure riche en acides aminés acides et composé d'une succession d'hélices alpha lui conférant une grande flexibilité (Kindler et al., 1990). Cette succession d'hélices est interrompue par la région de haute identité de séquence entre les acides aminés 650 et 940 de MAP2b, laquelle contient des sites consensus de phosphorylation pour la kinase dépendante de l'AMPc (AMPc kinase), la kinase dépendante de la Ca^{2+} /calmoduline (CaM kinase) et les MAPKinases. Le domaine de projection contiendrait également un site consensus de liaison à l'actine, dont l'implication dans la liaison de MAP2 à l'actine reste à démontrer (Sattilaro et al., 1981). La région de haute identité de séquence entre les acides aminés 1370 et 1650 de MAP2b est située à la frontière entre le domaine de liaison aux microtubules et le domaine de projection. Cette région riche en proline contient plusieurs sites potentiels de phosphorylation et une séquence consensus pour la liaison de la calmoduline. Cette séquence est également impliquée dans la liaison de MAP2 aux microtubules (Feralli et al., 1994, Goode et al., 1997).

La fonction de la protéine MAP2 dépend de l'expression spatio-temporelle des différentes isoformes mais également de son état de phosphorylation. La forme hyperphosphorylée de MAP2 montre une plus faible affinité pour les microtubules, ce qui fait

de la phosphorylation un moyen de contrôle de l'activité de MAP2 (Brugg et Matus, 1991; Drewens et al., 1997). MAP2b peut être phosphorylée *in vitro* par les MAPKinases, la kinase dépendante de l'insuline, la kinase dépendante du Ca^{2+} et des phospholipides, la kinase dépendante de la Ca^{2+} /calmoduline (CaM kinase) et la kinase dépendante de l'AMPc de type II (AMPc kinase) (Hernandez et al., 1987; Yamauchi et Fujisawa, 1988; Drewens et al., 1997), entre autres. L'analyse moléculaire des séquences de MAP2b et MAP2c a permis d'identifier des séquences consensus de phosphorylation pour la CaM kinase, l'AMPc kinase (Kindler et al., 1990), les MAPKinases et la kinase Cdk5. MAP2b contient quatre sites potentiels de phosphorylation par l'AMPc kinase, onze sites potentiels de phosphorylation par la CaM kinase, trois sites potentiels pour la Cdk5, ainsi que plusieurs sites potentiels de phosphorylation par les MAPKinases. Ces sites sont concentrés dans deux régions fortement conservées. La première est située entre les acides aminés 650 et 940 de MAP2b, dans le domaine de projection. Le second est situé entre les acides aminés 1370 et 1650 de MAP2b, dans une région riche en proline qui contient le site d'épissage de MAP2c.

Lors de la production de MAP2c, 1372 acides aminés sont éliminés du domaine de projection de MAP2b. Cet épissage enlève ainsi le domaine putatif de liaison de la calmoduline et la région conservée riche en sites de phosphorylation potentiels entre les acides aminés 650 et 940 de MAP2b (cf. Figure 2).

4. Les études de fonction de MAP2 :

4.1. Études de perte de fonction :

Plusieurs laboratoires ont essayé d'élucider la fonction de la protéine MAP2 par des études de perte de fonction. Deux approches ont pour cela été utilisées, soit l'approche antisens et la production de souris nulles. L'approche antisens consiste à insérer à l'intérieur des cellules un ARN synthétique complémentaire à la séquence en 5' de l'ARNmessenger cible, ici, celui de MAP2. L'ARN double brin ainsi formé est éliminé par la cellule, ce qui empêche la production de la protéine encodée par l'ARNmessenger cible.

L'approche antisens a été utilisée sur des cultures primaires de neurones et sur des lignées cellulaires de carcinomes embryonnaires de souris. Lorsqu'on supprime l'expression de la protéine MAP2 dans des neurones du cervelet en culture primaire, ces neurones deviennent incapables d'émettre des prolongements (Caceres et al., 1992). La protéine MAP2 serait donc impliquée dans la formation des prolongements neuritiques. L'utilisation de l'approche antisens sur une lignée cellulaire de carcinome embryonnaire de souris, les cellules EC P19, donne des résultats similaires (Dinsmore et Solomon, 1991). Lorsqu'on supprime l'expression de la protéine MAP2, les cellules EC P19 sont incapables de former des prolongements neuritiques suite à l'induction par l'acide rétinoïque. Ces cellules continuent également à se diviser, bien qu'elles expriment plusieurs marqueurs de différenciation des neurones (Dinsmore et Solomon, 1991). Lors de la différenciation neuronale, MAP2 semble nécessaire pour la sortie du cycle

cellulaire des neurones et pour l'initiation de la formation de prolongements dans les cellules en culture.

La technologie des souris nulles permet de produire des mutants qui n'expriment pas le gène codant pour la protéine MAP2. Les résultats préliminaires du laboratoire de Hirokawa indiquent que la perte de l'expression de MAP2 n'est pas létale pour ces animaux et ne semble pas non plus affecter le développement embryonnaire neuronal. Les neurones des souris n'exprimant pas MAP2 paraissent se développer normalement et complètement fonctionnels (Harada et al., 1998, non publié). Une redondance fonctionnelle dans le système des protéines associées aux microtubules (DiTella et al., 1996) permettrait donc, *in vivo*, de compenser pour la perte de MAP2 dans les neurones. Dans cette mesure, MAP2 ne semblerait donc pas jouer un rôle primordial dans le processus de différenciation neuronal *in vivo*. Toutefois, il est bon de noter qu'aucune étude n'a jusqu'à présent été faite sur les souris transgéniques âgées. MAP2 pourrait avoir un rôle plus important dans la plasticité neuronale ou le maintien de l'architecture neuronale chez les sujets âgés.

Les diverses études de perte de fonction de MAP2 ne peuvent malheureusement pas distinguer entre les effets des différentes isoformes de MAP2. Toutes les isoformes de MAP2 proviennent du même gène par épissage alternatif et possèdent donc la même séquence en 5'. L'expression des isoformes de la protéine MAP2 est donc réprimée en bloc, sans possibilité de réprimer une isoforme spécifique à la fois.

4.2. Études de gain de fonction :

Plusieurs études de gain de fonction ont également été effectuées sur la protéine MAP2. L'ADN codant pour la protéine MAP2 a été inséré dans des lignées cellulaires qui n'expriment pas MAP2 de façon endogène. On peut ainsi visualiser l'effet spécifique des deux isoformes MAP2b et MAP2c sur la formation de prolongements. L'expression de l'isoforme juvénile MAP2c dans les cellules Hela induit une réorganisation des microtubules et la production de multiples prolongements (Ferralli et al., 1994). De même, l'expression des deux isoformes MAP2b et MAP2c dans les cellules Sf9 donne lieu à l'assemblage et la stabilisation des microtubules, ainsi qu'à la formation de prolongements cytoplasmiques. De plus, le phénotype induit diffère selon l'isoforme exprimée (Leclerc et al., 1993; Leclerc et al., 1996). L'isoforme juvénile MAP2c induit la formation de multiples prolongements fins et courts ressemblant à des neurites mineures dans 60 % des cellules Sf9 infectées. L'expression de l'isoforme adulte MAP2b entraîne dans seulement 20 % des cellules infectées la formation d'un prolongement unique plus épais ressemblant à une dendrite (Leclerc et al., 1993; Leclerc et al., 1996). Si les deux isoformes sont capables de se lier aux microfilaments d'actine, seul MAP2c est capable de réorganiser ces microfilaments pour former des lamellipodes d'actine et des prolongements riches en microtubules lorsqu'on exprime les deux isoformes dans la lignée cellulaire M2 (Cunningham et al., 1997). Cette lignée cellulaire n'exprime pas la protéine de liaison à l'actine ABP-280 ce qui la rend incapable de stabiliser son cytosquelette d'actine. Ces données suggèrent un rôle prédominant pour MAP2c dans la formation de prolongements via une interaction accrue avec les

microfilaments d'actine. La protéine MAP2b aurait plutôt un rôle dans la stabilisation des prolongements.

Toutefois, si les études de gain de fonction effectuées jusqu'à présent permettent d'envisager le problème de la fonction spécifique de chaque isoforme de MAP2, leurs résultats ne peuvent être transposés dans un modèle neuronal car les neurones expriment MAP2 de façon endogène.

5. Approche expérimentale :

Afin d'aborder le problème de la fonction spécifique des différentes isoformes de MAP2 dans un modèle neuronal, nous avons utilisé une approche d'expression de mutants dominants négatifs dans les cellules en cultures EC P19. Le comportement de ces mutants a d'abord été vérifié dans les cellules Sf9.

5.1. Le modèle Sf9 :

La lignée cellulaire Sf9 est une lignée de cellules ovariennes de l'insecte *Spodoptera frugiperda*. Les cellules de cette lignée sont la cible privilégiée du virus *Autographa californica* (ACNPV), un membre de la famille des Baculoviridae. Cette particularité permet d'insérer facilement de l'ADN étranger à l'intérieur des cellules Sf9 par infection avec un baculovirus recombinant (Kosik et McConlogue, 1994). Les cellules Sf9 sont normalement rondes et ne présentent aucune organisation visible du cytosquelette. Aucune MAP endogène n'a jusqu'ici été identifiée dans ces cellules. L'expression de protéines associées aux microtubules dans ces cellules induit des

changements morphologiques importants, notamment l'organisation de microtubules en faisceaux et la production de prolongements cytoplasmiques (Kosik et McConlogue, 1994). L'expression de différents membres de la famille des MAPs induit des patterns de production de prolongements cytoplasmiques caractéristiques de la MAP exprimée. L'expression de la MAP tau, normalement exprimée dans l'axone des neurones, induit la production d'un seul prolongement avec des caractéristiques axonales dans la majorité des cellules infectées (Knops et al., 1991). Au contraire, l'expression de l'isoforme juvénile MAP2c induit l'élaboration de prolongements multiples ressemblant à des neurites mineures (Leclerc et al., 1993). Plusieurs autres MAPs sont capables d'induire la production de prolongements cytoplasmiques dans les cellules Sf9, notamment les MAPs motrices de la famille des kinésines et des dynéines (Sharp et al., 1996; Sharp et al., 1997). La capacité de formation de prolongements cytoplasmiques et la facilité d'y introduire de l'ADN étranger font des cellules Sf9 un bon modèle pour les études de gain de fonction des MAPs de mammifères.

5.2. Le modèle EC P19 :

La lignée cellulaire EC P19 est une lignée de carcinome embryonnaire de souris. Les cellules de cette lignée sont immortelles et prolifèrent rapidement en culture. Ces cellules ont un potentiel de différenciation embryonnaire élevé car, sous les bonnes conditions de culture, elles peuvent se différencier en une grande variété de types cellulaires. Un traitement au diméthyle sulfoxyde (DMSO) induit une différenciation des cellules EC P19 en cellules musculaires alors qu'un traitement à l'acide rétinoïque induit une différenciation en dérivés du neuroectoderme (MacPherson et McBurney, 1995).

Les cellules sont cultivées en présence d'acide rétinoïque pendant quatre jours pour donner des neurones, des cellules gliales et des fibroblastes (Jones-Villeneuve et al., 1982; Bain et al., 1998). Les neurones issus des cellules EC P19 présentent toutes les caractéristiques de neurones fonctionnels (MacPherson et McBurney, 1995). Ils sont post-mitotiques et possèdent plusieurs prolongements dont un possède les caractéristiques d'un axone alors que les autres ressemblent à des dendrites. Les neurones issus des cellules EC P19 expriment une grande variété de marqueurs neuronaux dont les neurofilaments, l'isoforme neuronal β III de la tubuline, l'isoforme neuronal de l'enzyme enolase, la MAP tau et MAP2 (Chiu et al., 1995; Jonk et al., 1994; Tanaka et al., 1992). Ces neurones sont également capables de produire des synapses fonctionnelles capables de potentiation à long terme (Long Term Potentiation) et expriment une grande variété de neurotransmetteurs. La majorité (~60 %) des neurones issus des cellules EC P19 expriment le neurotransmetteur GABA, mais certains neurones expriment la somatostatine, le neuropeptide Y, l'acétylcholine, le glutamate ou une catécholamine (MacPherson et McBurney, 1995). Le système des cellules EC P19 est donc propice à l'étude du développement neuronal embryonnaire. De plus, ces cellules sont plus facilement manipulables dans leur état non-différencié que les neurones primaires. On peut donc y introduire de l'ADN codant pour des formes mutantes de MAP2 avant d'induire la différenciation neuronale, pour examiner l'effet de ces mutants sur le processus de différenciation.

5.3. L'effet dominant négatif :

Pour pouvoir étudier spécifiquement la fonction des isoformes MAP2b et MAP2c dans un modèle neuronal, nous avons utilisé une approche d'expression de mutants dominants négatifs car les cellules neuronales expriment la protéine MAP2 de façon endogène. L'utilisation de mutants dominants négatifs consiste à découpler les différents domaines de la protéine cible en surexprimant dans la cellule un mutant tronqué de la protéine cible (Brandt et al., 1995; Pieper et al., 1995; Sun et al., 1997). La surexpression des mutants permettrait de déplacer la protéine native endogène et de favoriser l'utilisation par la cellule de la protéine tronquée. Nous voulions surexprimer des protéines tronquées de MAP2 contenant un seul des deux domaines fonctionnels de la protéine. En exprimant des isoformes tronquées de MAP2, on espérait ainsi bloquer sélectivement la fonction d'une isoforme à la fois. Par découplage des différents domaines de la protéine MAP2, on s'attendait à supprimer l'effet régulateur exercé par un des domaines sur l'autre, et/ou la liaison d'un élément intracellulaire nécessaire au bon fonctionnement de la protéine (Brandt et al., 1995). En surexprimant le domaine de projection de MAP2b ou celui de MAP2c, on croyait pouvoir altérer sélectivement la fonction de l'isoforme correspondant. La surexpression du domaine de liaison aux microtubules de MAP2 bloquerait la fonction des deux isoformes à la fois, puisque ce domaine est identique dans les deux isoformes. Un découplage des différents domaines permettrait de vérifier si le domaine de projection de MAP2 régule directement ou indirectement l'activité du domaine de liaison aux microtubules. Par contre, nous n'observerions pas de changement phénotypique si les deux domaines agissent de façon indépendante.

6. Objectif de ce travail :

Afin d'étudier le rôle des isoformes MAP2b et MAP2c dans un modèle de différenciation neuronale, nous avons effectué la série d'expériences suivante :

1) Nous avons construit des mutants de MAP2 qui correspondent aux différents domaines fonctionnels de MAP2b et MAP2c. Ces mutants devraient permettre d'élucider la fonction de MAP2b et MAP2c par effet dominant négatif.

2) Avant d'exprimer ces constructions dans un système neuronal, nous avons testé leur comportement dans les cellules Sf9. À cet effet, nous avons généré des baculovirus recombinants exprimant les constructions de MAP2 que nous avons co-infectés, dans les cellules Sf9, avec les virus exprimant les protéines complètes.

3) Après transfert des constructions dans un vecteur d'expression eucaryote, nous avons exprimé nos constructions dans les cellules EC P19. Nous avons induit la différenciation neuronale de ces cellules pour vérifier si l'expression des formes mutantes de MAP2 modifie le phénotype neuronal.

MATÉRIEL ET MÉTHODES

1. Biologie moléculaire :

1.1. Digestion enzymatique :

L'ADN plasmique a été digéré selon le protocole recommandé par le manufacturier (New England Biolabs Inc. et Gibco-BRL Inc.). Nous avons utilisé les enzymes BamHI, BsaBI, EcoRI, NotI, PstI, SmaI, SnaBI, SphI, XbaI et XhoI. Cinq à dix unités d'enzymes ont été incubées pendant une heure avec l'ADN et le tampon enzymatique approprié, dans un volume total de 50 à 100 μ l à 37°C. L'enzyme SmaI a été incubée dans les mêmes conditions à température de la pièce.

1.2. Réaction en chaîne à la polymérase (PCR) :

Pour construire les formes tronquées de MAP2, des sites de coupure par des enzymes de restriction ont été insérés par PCR dans l'ADN complémentaire codant pour cette protéine. Cent ng d'ADN cible ont été mélangés avec 250 ng de chacun des oligonucléotides et 200 μ M de chacun des quatre dNTPs, dans le tampon approprié fourni par le manufacturier contenant 2 mM de magnésium. Nous avons utilisé 5 U d'enzyme Pfu (Stratagène n°. de catalogue 600153) par réaction et effectué 30 cycles de polymérisation dans un appareil Perkin-Elmer 540. Le produit de PCR A a été généré par des cycles d'une minute de dénaturation à 96°C, suivis d'une minute d'hybridation des oligonucléotides à 50°C et de trois minutes d'extension à 72°C. Le produit de PCR B a été généré par des cycles d'une minute de dénaturation à 96°C, suivis d'une minute

d'hybridation à 70°C et de deux minutes d'extension à 78°C. Le produit de PCR C a été élaboré par des cycles d'une minute de dénaturation à 96°C, suivis d'une minute d'hybridation à 55°C et d'une minute d'extension à 72°C. Le produit de PCR D a été élaboré par des cycles d'une minute de dénaturation à 96°C, suivis d'une minute d'hybridation à 53°C et d'une minute d'extension à 72°C. Tous les produits de PCR ont été insérés dans le vecteur pSTBlue-1 en utilisant la trousse pSTBlue-1 Perfectly Blunt Cloning Kit de Novagen (n°. de catalogue 70191-3) pour pouvoir les couper à leurs extrémités avec des enzymes de restriction.

1.3. Ligation :

La ligation des fragments d'ADN a été effectuée dans un volume de 10 μ l, en présence de T4 DNA ligase NEB concentrée (New England Biolabs Inc.), dans le tampon de ligation NEB fourni avec l'enzyme (Tris-HCl 50 mM pH 7.8, MgCl₂ 10mM, dithiothreitol 10mM, ATP 1mM et BSA 50 μ g/ml), pendant 16 heures à 16°C. Nous avons utilisé 20 U/ μ l d'enzyme pour les ligations de fragments d'ADN à extrémités cohésives et 200 U/ μ l d'enzyme pour les ligations à extrémités franches.

1.4. Transformation :

Le produit de ligation (10 μ l) a été introduit dans des cellules bactériennes compétentes XL1-Blue par transformation. L'ADN a d'abord été incubé avec 100 μ l de cellules compétentes à 4°C pendant 30 minutes, puis les cellules ont subi un choc thermique à 42°C pendant 90 secondes. Les cellules ont été ensuite réincubées à 4°C pendant 20 minutes avant de compléter le volume total à 500 μ l avec du milieu de culture LB. Les cellules ont été incubées sous agitation à 37°C pendant une heure avant d'être étalées sur un milieu sélectif contenant 50 μ g/ml d'ampicilline.

1.5. Minipréparation d'ADN (lyse alcaline) :

Les colonies isolées des pétris ont été repiquées, inoculées dans 2 ml de milieu LB contenant de l'ampicilline et incubées à 37°C avec agitation pendant 12 à 16 heures. Une adaptation de la technique classique de lyse alcaline a été utilisée afin d'isoler l'ADN plasmique des bactéries (Xiang et al., 1994). Dans un premier temps, le culot provenant de 1,5 ml de bouillon de culture a été resuspendu dans 100 μ l de TEG (50 mM glucose, 25 mM Tris-HCl pH 8,0 et 10 mM EDTA pH 8,0). Nous avons ensuite ajouté 200 μ l de solution de lyse (0,2M NaOH et 1 % SDS) et mélangé par inversion. La réaction de lyse a été interrompue en ajoutant 150 μ l d'acétate de potassium 5M et en mélangeant rapidement. Après centrifugation, le surnageant a été précipité avec 1 ml d'éthanol 95 %. Finalement le culot d'ADN a été lavé avec 150 μ l d'éthanol 70 % et séché avant d'être resuspendu dans 100 μ l de Tris-HCl 10 mM pH 8,0 contenant de la RNase. Cet ADN plasmique a été visualisé sur gel d'agarose et analysé par digestion enzymatique. Les bouillons de culture des clones ayant intégrés les bons inserts dans l'orientation désirée ont ensuite été utilisés pour inoculer 50 ml de milieu LB afin d'isoler une grande quantité d'ADN plasmique de bonne qualité.

1.6. Maxipréparation d'ADN :

L'ADN plasmique des clones sélectionnés a été isolé en utilisant la trousse Quantum Prep pour Midiprep de Bio-Rad (n° de catalogue 732-6120), qui permet d'isoler rapidement de l'ADN de bonne qualité. Nous avons employé cette trousse selon les recommandations du manufacturier. Les bactéries sont lysées selon le principe de la lyse alcaline avec 5 ml de solution de lyse, après avoir été resuspendues dans 5 ml de tampon de resuspension. La réaction de lyse a ensuite été arrêtée par addition de 5 ml de

tampon de neutralisation. Une résine permettant de lier spécifiquement l'ADN plasmique a été ajoutée au lysat et la résine a ensuite été récupérée sur une colonne. Celle-ci a été lavée plusieurs fois avec le tampon de lavage et l'ADN a été élué avec 600 μ l d'eau stérile. Un rendement de 0,3 à 0,8 mg d'ADN plasmique a été obtenu en utilisant cette trousse. L'ADN a ensuite été précipité à l'EtOH 100 % et stérilisé par lavage à l'EtOH 70 % pour pouvoir être introduit dans des cellules eucaryotes par transfection.

1.7. Séquençage :

L'ADN des constructions mutantes obtenues a été séquençé pour vérifier que l'utilisation de la technique de PCR n'a pas introduit de mutation modifiant la séquence des acides aminés de la protéine encodée par cet ADN. Nous avons séquençé l'ADN par la méthode dideoxy de Sanger en utilisant la trousse de séquençage Cycle Sequencing Kit de Pharmacia Biotech (27-1694-01), qui permet de coupler la réaction de séquençage à une réaction de PCR pour faciliter la dénaturation de l'ADN et la génération d'un ADN cible simple brin. Nous avons utilisé la trousse selon les recommandations du manufacturier et selon le protocole de marquage des fragments générés par incorporation lors de leur extension. Nous avons utilisé de l'ATP marqué au soufre 35, [α -³⁵S] dATP, pour augmenter la clarté des autoradiographies obtenues. Après l'arrêt de la réaction par addition de la solution Stop (97,5 % formamide déionisée, 10 mM EDTA, 0,3 % xylène cyanol et 0,3 % bleu de bromophénol), les échantillons ont été chauffés à 85 °C pendant 2 minutes et 4 μ l de chaque réaction appliqué sur un gel de polyacrylamide à 6 % contenant 8M d'urée. Les gels ont été préchauffés une demi-heure à une heure en maintenant le courant électrique à 60 W constant, 100 mA et 1800 V. Nous avons laissé

migrer les échantillons pendant 1 heure et 30 minutes puis nous les avons réappliqués et laissé migrer encore 1 heure et 30 minutes de façon à obtenir une plus longue lecture de la séquence. Le gel a ensuite été fixé avec une solution de 10 % méthanol et 10 % acide acétique avant d'être transféré sur un papier filtre et séché. Le gel a ensuite été exposé 48 à 72 heures avec un film Kodak BioMax.

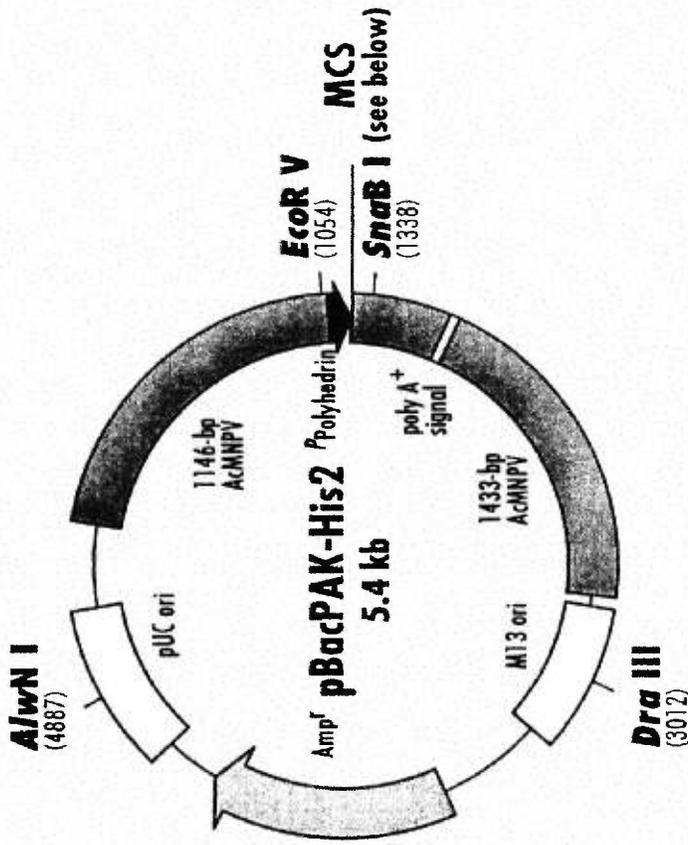
2. Construction des mutants :

2.1. MAP2b complète :

Nous avons commencé par générer le vecteur contenant l'ADNc correspondant à la protéine MAP2b complète (MAP2b). Pour cela, nous avons d'abord digéré l'ADNc de MAP2b cloné dans le vecteur pVL1392 par l'enzyme BamHI pour l'insérer dans le vecteur pBacPAK-His2 digéré par BamHI et BglII. La séquence d'ADN codant pour la protéine MAP2b a ensuite été mise dans le cadre de lecture de l'épitope 6xHis en enlevant la séquence non-codante en 5' de l'ADNc. Nous avons enlevé cette séquence en insérant par PCR un site BamHI couvrant le codon initiateur de la traduction dans l'ADNc de l'isoforme MAP2b. Le produit de PCR a été cloné dans le vecteur pSTBlue-1 (PCR-pSTBlue). PCR-pSTBlue-1 contenant le site BamHI a ensuite été digéré avec les enzymes BamHI et XhoI et sous-cloné dans le vecteur pBacPAK-His2 digéré avec ces mêmes enzymes (PCR-pBacPAK-His2). Finalement, PCR-pBacPAK-His2 a été digéré avec l'enzyme de restriction NcoI puis inséré dans les sites NcoI du vecteur MAP2b-BacPAK-His2 (cf. Figure 3A et 4A). Cette première construction a été générée par un autre étudiant du laboratoire, Dave Bélanger, qui travaillait sur un projet connexe.

Figure 3: Vecteurs utilisés pour introduire les constructions de MAP2 dans les cellules Sf9 et les cellules EC P19. A) Vecteur pBacPAK-His2 utilisé pour les constructions de MAP2. Les constructions ont été insérées dans le cadre de lecture de l'épitope His par le site BamHI. B) Vecteur de sélection PGKPuro conférant la résistance à la puromycine aux cellules EC P19 transfectées. C) Vecteur d'expression pKJ1ΔF utilisé pour exprimer nos constructions dans les cellules EC P19. Nos constructions ont été insérées dans le site SmaI pour qu'elles soient en aval du promoteur PGK. Le vecteur contient également le signal de polyadénylation de la phosphoglycérate kinase.

A)



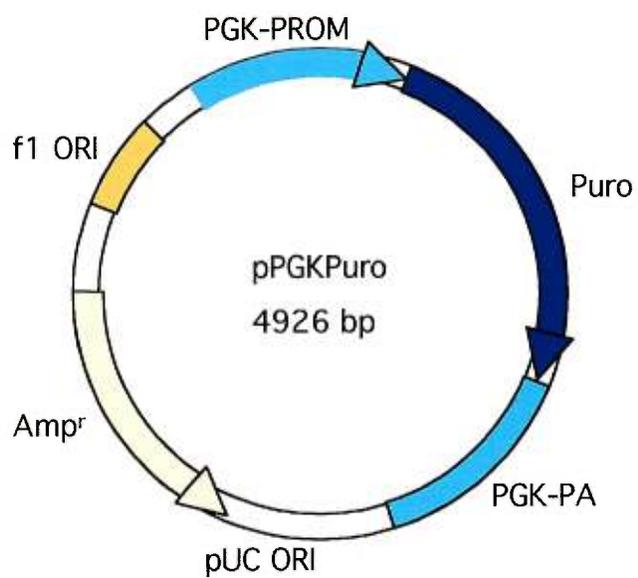
1144

• Met ATACCATG GGT CAT CAT CAC CAT CAC GGT GGT CGA CAA GCT TGG AIC CCT GCA GGC CTC GAG TTC GAA ICT AGA
Nco I Bst X I Sal I Hind III BamH I Pst I Stu I Xho I BstB I Xba I
 Acc I Sse8387 I
 6xHis

1221

• AGA ICT GGT ACC GAG CIC GAA TIC CCG GGC GGC CGC ITA ATT AAT TGA TCC GG
Bgl II Asp718 I Ecl36 II EcoR I Xma I Eag I Not I
 Kpn I Sac I Sma I Pac I
 STOPS

B)



C)

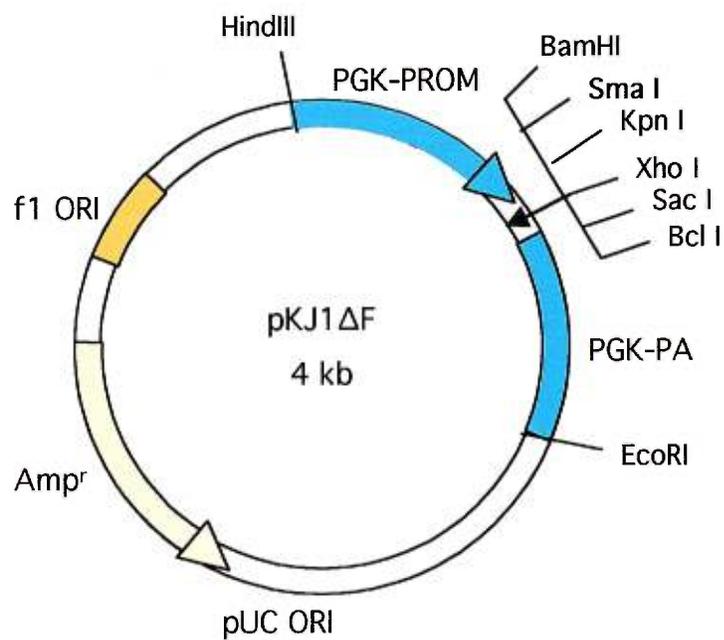
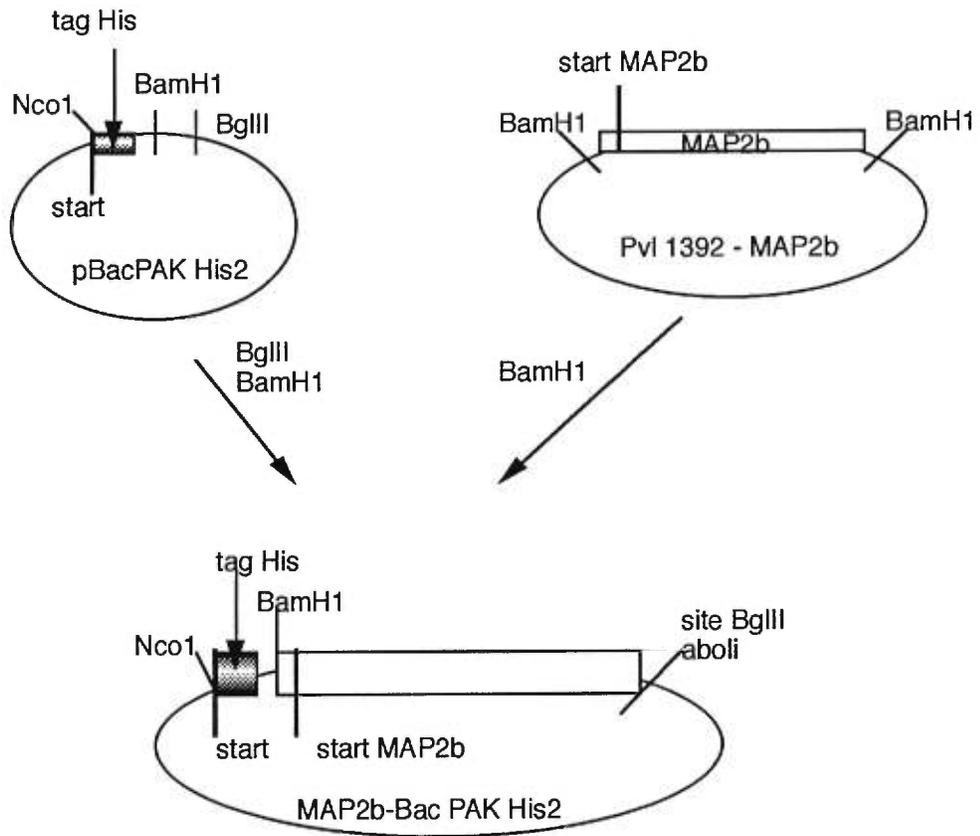
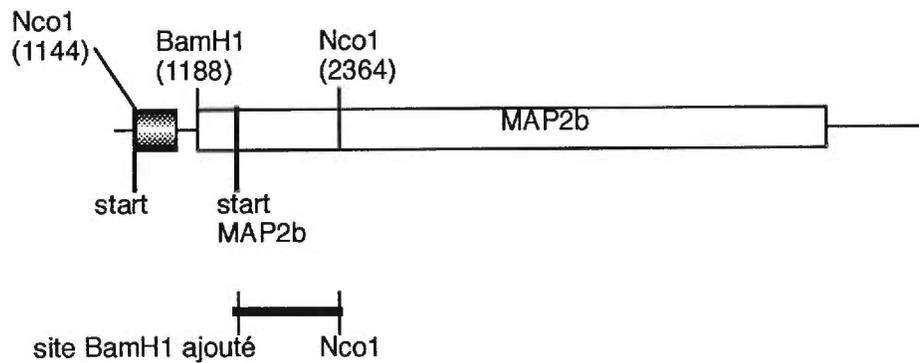


Figure 4 : Stratégies de clonage des constructions de MAP2. A) Stratégie de clonage pour obtenir MAP2b dans le cadre de lecture du vecteur pBacPAK-His2. B) Stratégie de clonage pour obtenir MAP2c dans le cadre de lecture du vecteur pBacPAK-His2. C) Stratégie de clonage pour obtenir le mutant Prob. D) Stratégie de clonage pour obtenir le mutant Proc. E) Stratégie de clonage pour obtenir le mutant Mt.

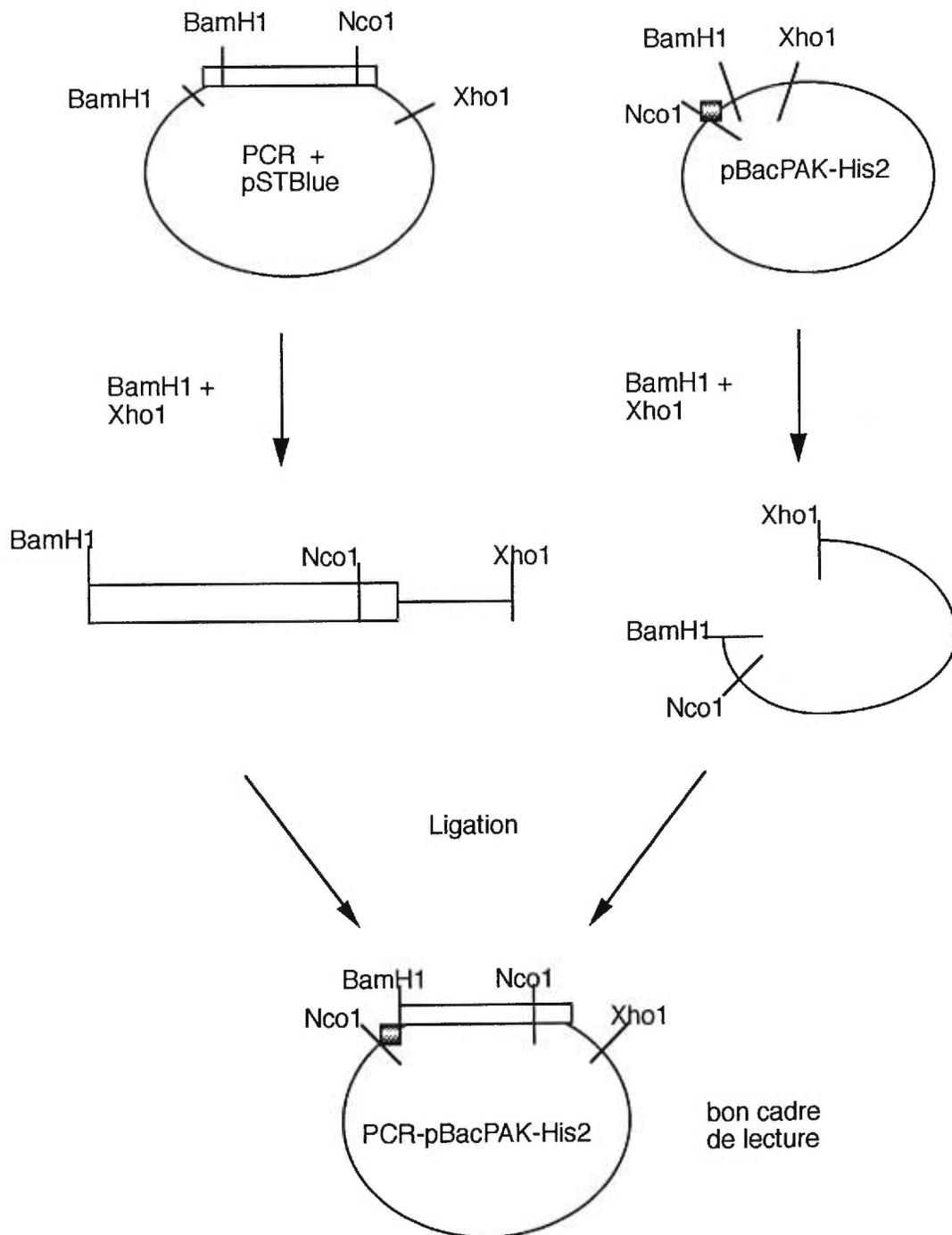
A) Stratégie de clonage de MAP2b dans le cadre de lecture du vecteur pBacPAK-His2



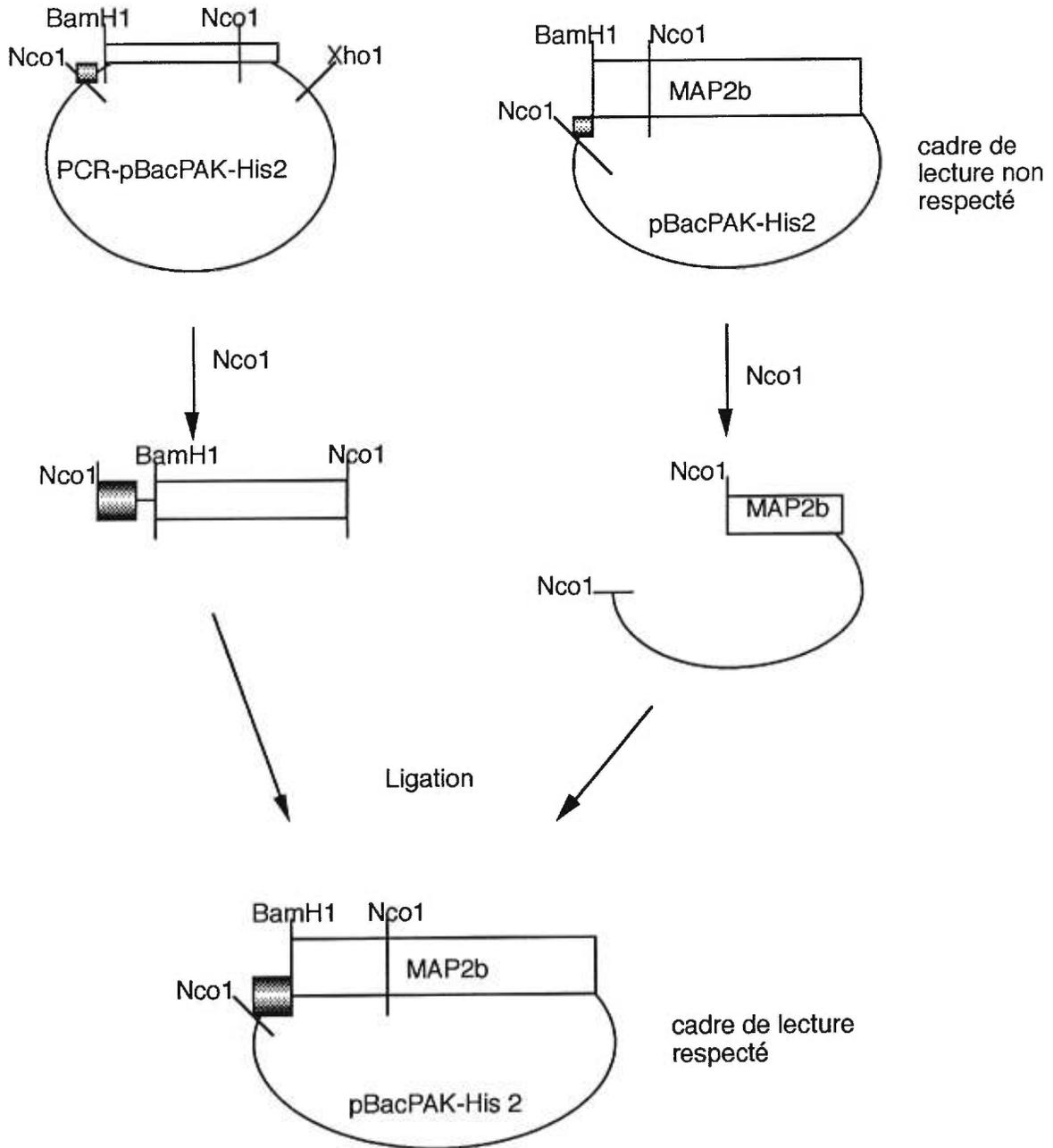
PCR :



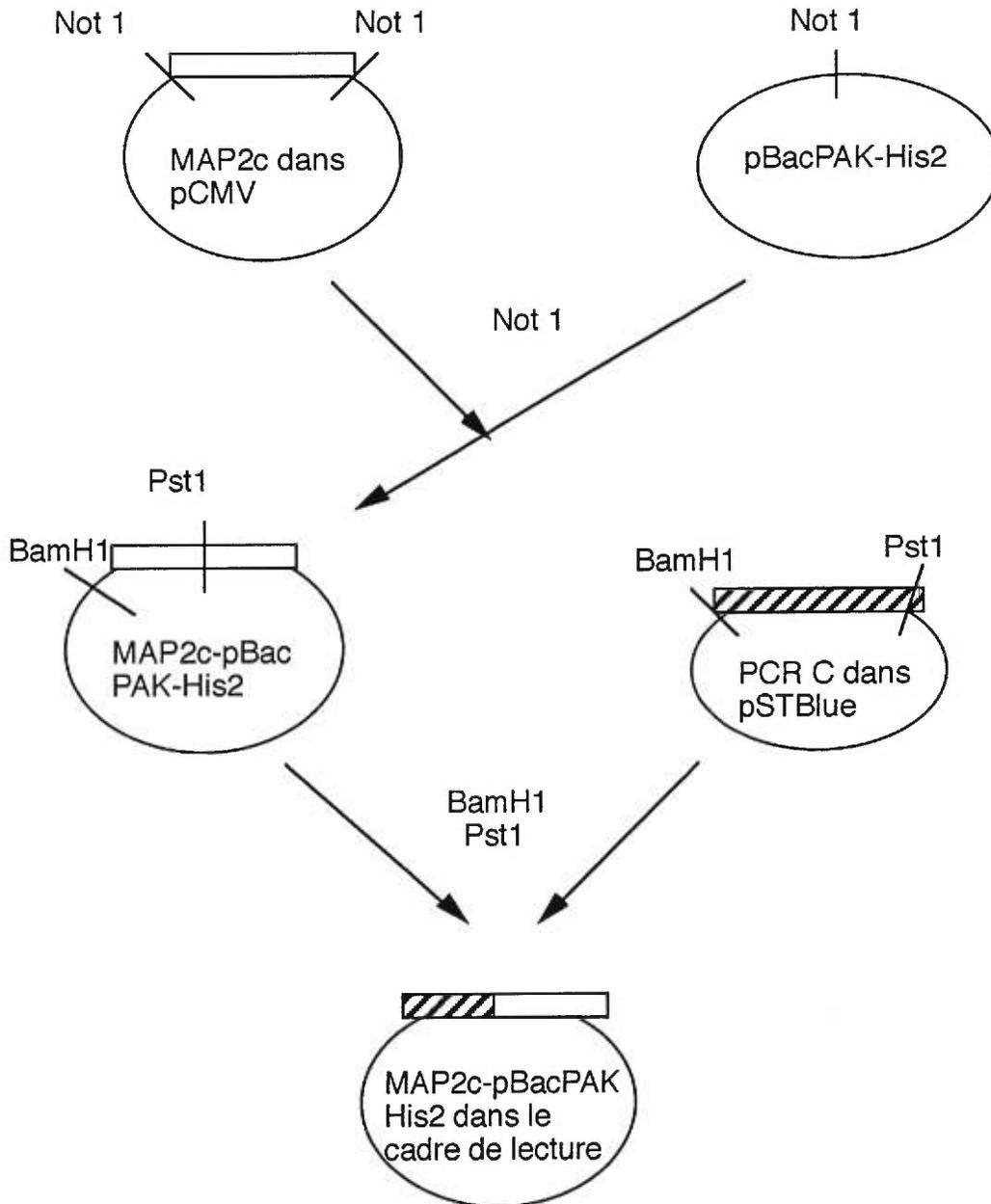
A) suite



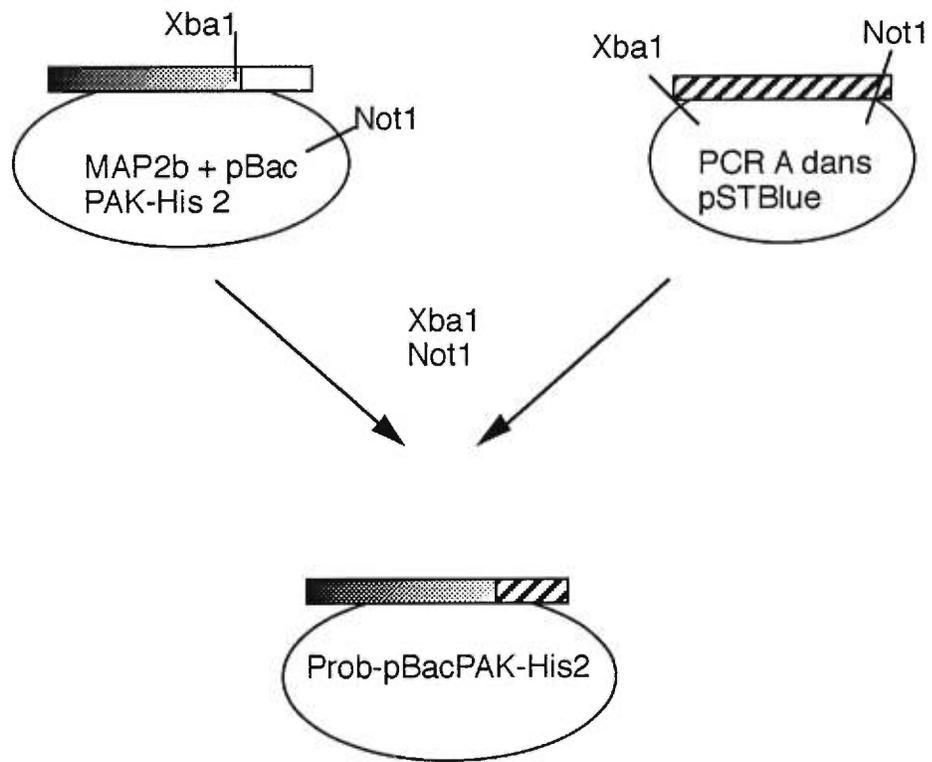
A) suite



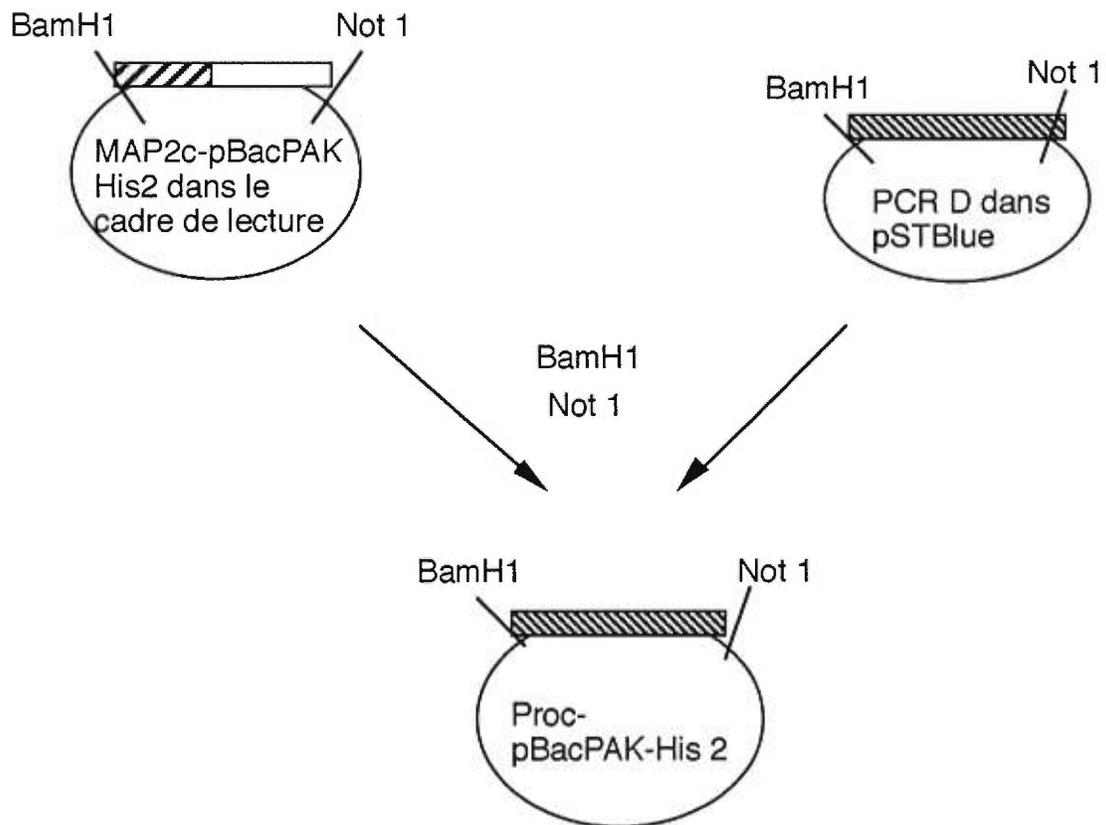
B) Stratégie de clonage pour MAP2c dans le cadre de lecture de pBacPAK-His2



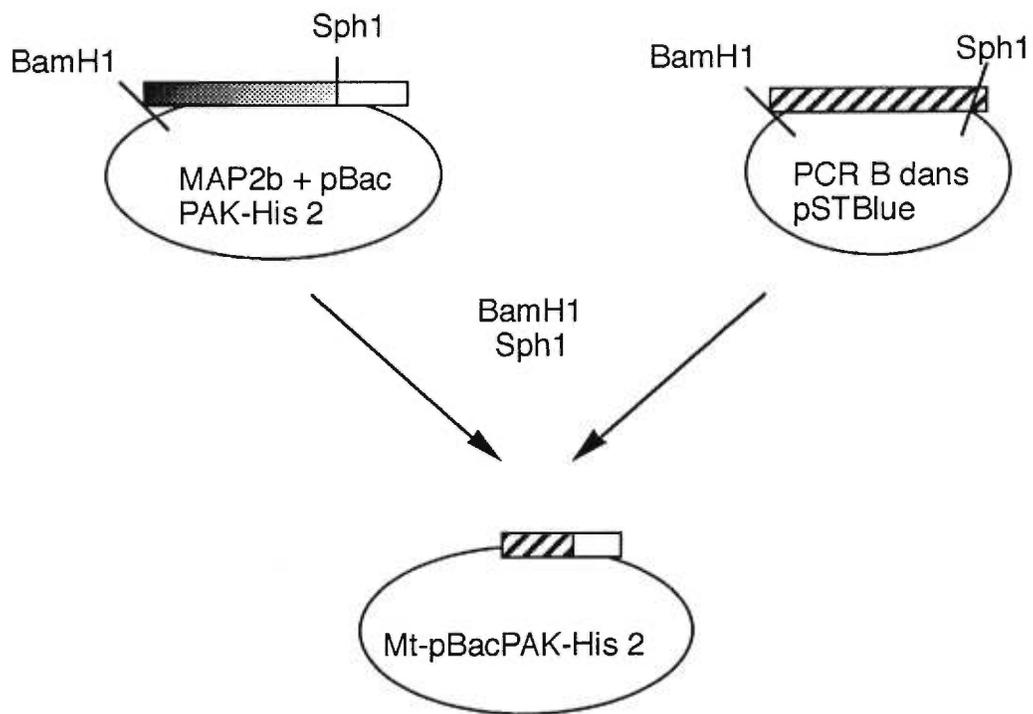
C) Stratégie de clonage pour la construction Prob



D) Stratégie de clonage pour la construction Proc



E) Stratégie de clonage pour la construction Mt



2.2. MAP2c complète :

Nous avons également produit une construction de MAP2 correspondant à l'ADNc de la protéine MAP2c complète (MAP2c). L'ADNc codant pour l'isoforme MAP2c a d'abord été extrait du vecteur pCMVNneo par digestion par l'enzyme de restriction NotI, pour être inséré dans le vecteur pBacPAK-His2 ouvert par cette même enzyme. Pour générer une protéine de fusion entre l'épitope 6xHis et la protéine MAP2c, nous avons enlevé le codon initiateur et la partie 5' non-codante de l'ADNc codant pour la protéine MAP2c, pour la mettre dans le cadre de lecture de l'épitope 6xHis. Pour cela, nous avons utilisé les oligonucléotides Cratprohis (5' cgcgatccgtgctgacgagaggaaagacgaa 3') et Cratproan-his (5' taaaggcagagctgcaggc 3'), pour réaliser un produit de PCR de 385 pb permettant d'insérer un site BamHI couvrant le codon initiateur dans l'ADNc de l'isoforme MAP2c (PCR C). Le produit de PCR C a ensuite été inséré dans le vecteur pSTBlue-1. Nous avons digéré le vecteur pBacPAK-His2 contenant l'ADNc codant pour MAP2c avec les enzymes de restriction BamHI et PstI, de façon à éliminer la partie non-codante en 5' de l'ADNc codant pour MAP2c, et nous avons remplacé cette séquence par le produit de PCR digéré par ces mêmes enzymes. Nous avons ainsi obtenu une construction codant pour la protéine MAP2c et contenant un épitope 6xHis en N-terminal (cf. Figure 3A et 4B).

2.3. Prob :

À partir de la construction MAP2b, nous avons élaboré les divers mutants de MAP2b par mutagenèse dirigée. La construction mutante Prob correspondant au domaine de projection de MAP2b a été générée en insérant par PCR un site NotI au nucléotide 4772. En utilisant l'oligonucléotide Brisprosens (5' atcaaggtctagattttgctgc 3')

et l'oligonucléotide Brisproantis (5'ttttccttttgccggccgccaagtcaccacttgctg 3'), nous avons réalisé un produit de PCR de 1,5 kb contenant les sites de restriction enzymatiques NotI et XbaI (PCR A). Ce produit de PCR a été inséré dans le vecteur pSTBlue-1 pour permettre sa digestion par des enzymes de restriction. Nous avons digéré la construction MAP2b avec les enzymes de restriction NotI et XbaI et remplacé cette séquence par le produit de PCR digéré par ces mêmes enzymes, éliminant ainsi la séquence en 3' du nucléotide 4772 jusqu'au nucléotide stop 5881 (cf. Figure 3A et 4C).

2.4. Proc :

À partir de la construction MAP2c, nous avons généré la construction correspondant au domaine de projection de l'isoforme MAP2c (Proc) en insérant par PCR un site NotI au nucléotide 444. En utilisant l'oligonucléotide Cratprosens (5' aacctataaataccatgggtcat 3') et l'oligonucléotide Cratproantis (5'ttttccttttgccggccgcttctccagtcagctgttg 3'), nous avons réalisé un produit de PCR de 380 pb qui contient les sites de restriction enzymatiques BamHI et NotI (PCR D). Nous avons ensuite inséré ce produit de PCR dans le vecteur pSTBlue-1. La construction MAP2c a été digérée par les enzymes de restriction BamHI et NotI, de façon à enlever les nucléotides 1 à 444, et cette séquence a été remplacée par le produit de PCR digéré par ces mêmes enzymes (cf. Figure 3A et 4D).

2.5. Mt :

Nous avons inséré par PCR un site de restriction pour l'enzyme BamHI au nucléotide 4765 de la construction MAP2b, pour réaliser la construction mutante Mt correspondant au domaine de liaison aux microtubules de MAP2b. Pour pouvoir enlever les nucléotides 1 à 4772, nous avons utilisé les oligonucléotides Brislisens (5'

cgggatccgtgctcaggctcctggtgctttt 3') et Brisliantis (5'cggggcctttgcatgctctctgaagt 3') pour réaliser un produit de PCR de 775 pb permettant d'insérer un site BamHI (PCR B). Ce produit de PCR a ensuite été inséré dans le vecteur pSTBlue-1. La construction contenant l'ADNc de MAP2b a été digérée par les enzymes de restriction BamHI et SphI, ce qui permet d'enlever la séquence d'ADN codant pour le domaine de projection. Cette séquence a été ensuite remplacée par le produit de PCR digéré par ces mêmes enzymes (cf. Figure 3A et 4E).

2.6. Transfert des constructions au vecteur d'expression eucaryote :

Pour transférer les constructions dans le vecteur pKJ1ΔF, nous avons digéré les constructions du vecteur pBacPAK-His2 avec les enzymes de restriction SnaBI et BsaBI, qui coupent les constructions en 5' du codon initiateur du vecteur pBacPAK-His2 et en 3' du codon stop. Les constructions ont été insérées dans le vecteur pKJ1ΔF ouvert par digestion avec l'enzyme de restriction SmaI (cf. Figure 3C). Les clones obtenus ont été vérifiés par digestion avec les enzymes de restriction EcoRI, BamHI ou XhoI, pour s'assurer que les fragments avaient été insérés dans la bonne orientation.

3. Expression des mutants :

3.1. Cultures cellulaires :

Nos constructions ont été exprimées dans deux lignées cellulaires différentes, soit la lignée Sf9 de cellules ovariennes d'insectes et la lignée EC P19 de cellules de carcinome embryonnaire de souris. La lignée Sf9, qui provient de chez American Type Culture Collection (ATCC), a été cultivée en monocouche dans le milieu de Grace

(Gibco-BRL Inc., n°. de catalogue 11300-043) additionné d'hydrolysate de lactalbumine, de yeastolate et de 10 % de sérum de veau fœtal (Hyclone). Des flasques à culture de 75 cm² ont été inoculés avec 5×10^6 cellules et incubés à 27 °C sans CO₂. Après trois jours, lorsque confluentes, les cellules ont été détachées de la flasque à culture et réensemencées.

Les cellules EC P19 provenant de chez ATCC ont été propagées dans un milieu α -MEM (Gibco-BRL Inc., n°. de catalogue 11900-024) additionné de 7,5 % de sérum de veau et de 2,5 % de sérum de veau fœtal à 37 °C sous 5 % de CO₂ (Bain et al., 1998). Avant d'arriver à confluence, les cellules ont été détachées du pétri avec une solution de trypsine 0,25 % contenant de l'EDTA dans le tampon de Hank (Gibco-BRL Inc.). Un dixième de ces cellules a été réinoculé dans du milieu frais. Pour induire la différenciation des cellules EC P19 en cellules neuronales, les cellules ont été cultivées en agrégats (Bain et al., 1998). Pour cela, 10 ml de milieu α -MEM additionné de 5 % de sérum de veau fœtal ont étéensemencés avec 1×10^6 cellules dans un pétri bactériologique (Fisher 8-757-13) de 100 mm en ajoutant de l'acide rétinoïque trans (RA) (Sigma, n°. de catalogue R-2625) à une concentration finale de 5×10^{-7} M. Le milieu de culture a été remplacé par du milieu frais contenant de l'acide rétinoïque après deux jours de culture. Après un total de quatre jours de culture en agrégats, ceux-ci ont été traités avec de la trypsine 0,25 % pour dissocier les cellules. Les cellules induites ont étéensemencées à une densité de 1 à $1,5 \times 10^6$ cellules/p60 dans des pétris traités à la polylysine avec le milieu neuronal sans sérum, N₂, pour permettre leur différenciation en cellules neuronales. Après deux jours de différenciation, de la cytosine arabinoside a été ajoutée au milieu de culture à une concentration finale de 10 μ M pour éliminer les

cellules non-neuronales en division. Les cellules différenciées ont été fixées après deux et cinq jours en culture.

3.2. Infection par le baculovirus :

Les baculovirus recombinants contenant les constructions de MAP2 à exprimer dans les cellules Sf9 ont été produits par Dave Bélanger. Ces virus ont été générés par recombinaison homologue entre le vecteur pBacPAK-His2, utilisé pour générer nos constructions, et l'ADN du virus de type sauvage. Les baculovirus recombinants ont été isolés et purifiés par dilutions illimitées. Pour l'infection par le baculovirus, des pétris de 60 mm ont été inoculés avec 2×10^6 cellules. Les cellules Sf9 ont été infectées en ajoutant le virus à différentes multiplicités d'infection (M.O.I.) dans le milieu de culture. Après 72 heures d'infection, les cellules ont été fixées et marquées par immunocytochimie avec des marqueurs de la différenciation neuronale (cf. section 3.4 du Matériel et méthodes), ou les pétris ont été grattés et les cellules récoltées pour analyser l'expression des protéines par immunobuvardage.

3.3. Transfection des cellules EC P19 :

L'ADN codant pour les différents mutants de MAP2 a été inséré par transfection dans les cellules EC P19 non-différenciées. Les cellules EC P19 ont été transfectées à l'aide du FuGene 6, un composé non-liposomal manufacturé par Boehringer Mannheim (n°. de catalogue 1 815 091). Des pétris de 60 mm ont étéensemencés avec 2×10^5 cellules 24 heures avant la transfection. Nous avons incubé $36 \mu\text{l}$ de FuGene 6 pendant cinq minutes à température de la pièce avec du milieu de culture sans sérum dans un volume total de $200 \mu\text{l}$. Nous avons ensuite ajouté au FuGene 6 un mélange de $2 \mu\text{g}$ d'ADN pPGKPuro, contenant le gène de la résistance à la puromycine, et $10 \mu\text{g}$ d'ADN

pKJ1ΔF exprimant les différents mutants de MAP2. Après une incubation de 15 minutes à la température de la pièce, le mélange FuGene 6/ADN a été ajouté au milieu de culture des cellules EC P19. Le milieu de culture a été remplacé 16 heures après pour diminuer la cytotoxicité du complexe FuGene 6/ADN. La puromycine a été ajoutée au milieu de culture 72 heures après la transfection à une concentration finale de 2 $\mu\text{g/ml}$ pour sélectionner les cellules ayant développé la résistance.

3.4. Immunocytochimie :

Pour l'immunocytochimie, les cellules ont été cultivées sur des lamelles de verre puis fixées 20 minutes dans une solution de paraformaldéhyde 4 % et glucose 4 % dans le tampon phosphate (PBS). Les cellules ont ensuite été perméabilisées par une incubation de cinq minutes dans une solution de 0,2 % Triton X-100 dans le PBS. Les différents mutants de MAP2 ont été révélés par les anticorps monoclonaux suivants: HM2 (dilué 1:200) qui reconnaît toutes les isoformes de MAP2, AP-20 (dilué 1:400) dirigé contre MAP2b (Sigma et Boehringer Mannheim), 46.1 (dilué 1:100) (gracieusement offert par le Dr. Virginia Lee) dirigé contre le domaine de liaison aux microtubules, l'anticorps anti-myc (dilué 1:100) (gracieusement offert par le Dr. Lisa McKerracher) et l'anticorps anti-His (dilué 1:20) (Santa Cruz Biotechnology Inc.). Les composantes du cytosquelette ont été révélées par l'anticorps contre l' α -tubuline (dilué 1:1000), la rhodamine-phalloïdine (diluée 1:200) dirigée contre l'actine, l'anticorps SMI-33 contre les neurofilaments (dilué 1:3000) et l'anticorps contre la vimentine (dilué 1:100). Les anticorps primaires ont été incubés 16 heures à 4 °C ou une heure et demie à la température de la pièce. Les différents anticorps primaires ont été visualisés à l'aide d'anticorps secondaires provenant de chez Jackson Immunoresearch Laboratories Inc.

(Bio/Can) couplés à des fluorochromes. Nous avons utilisé le fragment Fab de l'anticorps anti-souris couplé à la rhodamine (dilué 1:1000), un anticorps d'âne anti-souris couplé au FITC (dilué 1:1000) et un anticorps d'âne anti-lapin couplé au FITC (dilué 1:1000). Tous les anticorps ont été dilués dans le PBS contenant 5 % d'albumine sérique de bœuf (BSA). Après plusieurs lavages dans le PBS, les lamelles ont été montées dans l'alcool polyvinylique et les cellules visualisées au microscope à fluorescence.

3.5. Immunobuvardage :

L'expression des différents mutants dans les cellules a été vérifiée par la technique d'immunobuvardage (Western blot). Les protéines ont été extraites des cellules en resuspendant les culots cellulaires dans une solution de PBS 1X/SDS 1 % contenant des inhibiteurs de protéases. Les protéines ont été séparées sur un gel de polyacrylamide 7,5 % ou sur un gel à gradient linéaire de 4 à 15 % (Tris-HCl Ready gel, Bio-Rad, # 161-1158), puis transférées sur membrane de nitrocellulose. Les formes mutantes ont été révélées par des anticorps primaires contre MAP2, soit HM2 (dilué 1:4000), AP-20 (dilué 1:5000) et 46.1 (dilué 1:1000), et contre l'épitope His (dilué 1:200). Les protéines du cytosquelette ont été révélées par des anticorps primaires dirigés contre l' α -tubuline (dilué 1:5000) et contre la γ -actine (dilué 1:5000). Des anticorps secondaires (dilués 1:25000) couplés à la peroxydase ont été utilisés pour visualiser les anticorps primaires. Tous les anticorps ont été dilués dans le PBS contenant 3 % de lait. Après plusieurs lavages dans le PBS contenant 0,1 % de Tween, la présence des anticorps a été visualisée par une réaction de chemiluminescence en

utilisant le réactif Lumi-Light Western Blotting Substrate de Roche Biochemicals (n°. de catalogue 2015-200), selon les recommandations du manufacturier.

3.6. Analyse morphologique :

L'analyse morphologique des cellules a été effectuée par un seul observateur. Pour quantifier l'effet des doubles infections sur la croissance des prolongements des cellules Sf9, 450 cellules ont été comptées dans trois séries d'expériences pour chaque condition expérimentale. Pour quantifier l'effet obtenu dans les cellules EC P19, les cellules contenues dans une surface de 1,575 mm² ont été dénombrées dans chaque condition expérimentale. Nous avons répété dix fois ces mesures sur l'ensemble de la surface de la lamelle observée. La longueur des prolongements a été mesurée sur 75 cellules par condition expérimentale avec un microscope inversé Zeiss Axiovert 135TV et les images analysées à l'aide du programme d'analyse d'image Northern Eclipse 5.0.

RÉSULTATS

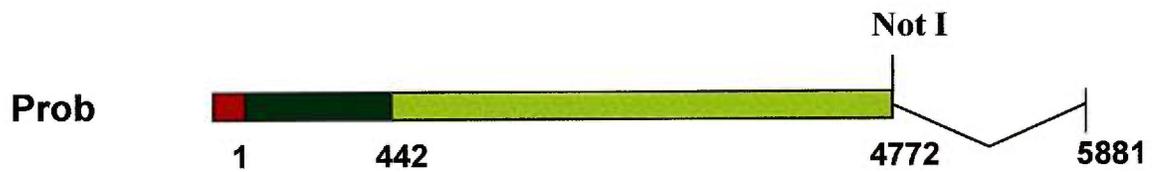
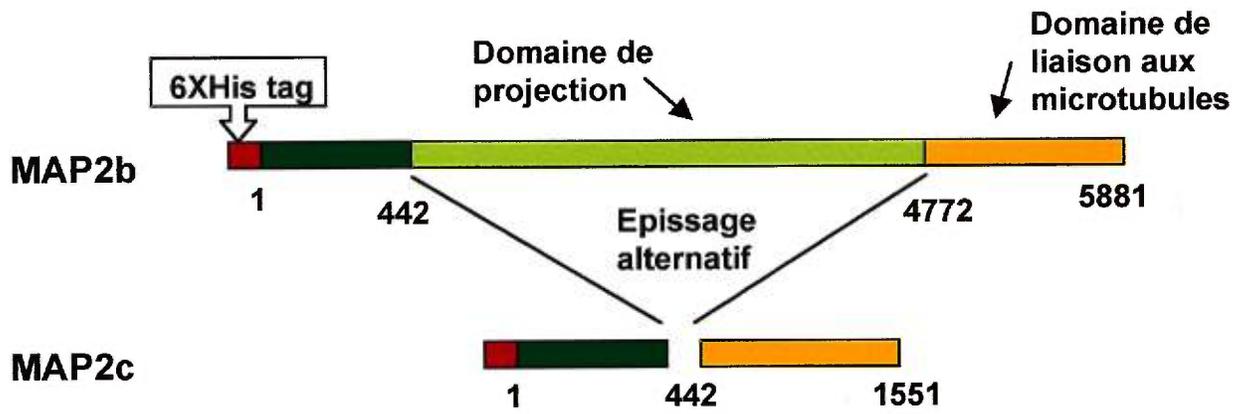
Nous avons construit des formes tronquées de MAP2 afin de caractériser les domaines fonctionnels de MAP2 impliqués dans la formation de prolongements cytoplasmiques. Nous avons utilisé pour cela deux systèmes d'expression, soit les cellules Sf9 et les cellules EC P19.

1. Construction des mutants :

Nous avons inséré cinq mutants de MAP2 dans le vecteur d'expression viral pBacPAK-His2 pour pouvoir les exprimer dans le système baculoviral de façon à tester leur comportement dans les cellules Sf9. Le vecteur pBacPAK-His2 utilisé permet d'insérer un épitope 6xHis en N-terminal des protéines exprimées (cf. Figure 3A). Toutes nos constructions contiennent donc un tel épitope qui permet d'effectuer la purification des protéines sur colonne d'affinité de cobalt et de visualiser l'expression des constructions par marquage immunofluorescent.

Nous avons inséré cinq formes différentes des mutants de MAP2 dans le vecteur pBacPAK-His2, soit l'ADN complémentaire (ADNc) correspondant à l'isoforme MAP2b complète (MAP2b), à l'isoforme MAP2c complète (MAP2c), au domaine de

Figure 5: Constructions exprimées dans les cellules Sf9 et les cellules EC P19. MAP2b: construction exprimant la protéine MAP2b. MAP2c: construction exprimant la protéine MAP2c. Prob: construction exprimant le domaine de projection de MAP2b. Proc: construction exprimant le domaine de projection de MAP2c. Mt: construction exprimant le domaine de liaison aux microtubules de MAP2, commun à MAP2b et à MAP2c. Toutes les constructions sont dans le cadre de lecture de l'épitope 6XHis en 5'. L'épitope 6XHis est représenté en rouge, le domaine de projection en vert et le domaine de liaison aux microtubules en orange.



projection de l'isoforme MAP2b (Prob), au domaine de projection de l'isoforme MAP2c (Proc) et au domaine de liaison aux microtubules, commun à MAP2b et MAP2c (Mt) (cf. Figure 5).

Les produits de PCR générés pour produire les mutants de MAP2 ont tous été séquencés. Nous avons ainsi vérifié qu'aucun changement indésirable n'a été introduit dans la séquence codante des mutants par le processus de PCR.

Les cinq constructions que nous voulions exprimer dans un système neuronal ont été incorporées dans le vecteur pBacPAK-His2 pour pouvoir produire des baculovirus recombinant exprimant les protéines encodées par ces constructions. Les cinq baculovirus exprimant les diverses constructions ont été produits par Dave Bélanger.

2. Vérification du comportement des mutants :

2.1. Infections simples des cellules Sf9 :

Nous avons d'abord exprimé nos différentes constructions de MAP2 dans le système baculoviral, pour vérifier le pattern de production de prolongements cytoplasmiques induit par chaque construction. Ces patterns serviront de référence pour les phénotypes induits par les co-infections. L'étudiant Dave Bélanger a exprimé les constructions de MAP2 dans le système baculoviral, dans le cadre de son projet de maîtrise (Bélanger et al., en préparation). Les cellules Sf9 ont été infectées avec les différents virus à une multiplicité d'infection (MOI) de 5 (cf. Figures 6 et 7). L'expression des différents domaines des protéines MAP2b et MAP2c dans les cellules Sf9 à l'aide du baculovirus a permis d'assigner des rôles particuliers à chacun de ces

Figure 6 : Patterns de production de prolongements cytoplasmiques induits par l'infection simple avec les constructions de MAP2 dans les cellules Sf9. A) Tableau illustrant la répartition quantitative des cellules Sf9 selon qu'elles élaborent 0, 1, 2 ou plus de 2 prolongements (n=3). Les constructions Prob et Proc n'ont pas été incluses dans cette quantification car elles n'induisent l'élaboration de prolongements dans aucune cellule. B) Histogramme représentant la répartition des cellules selon la construction exprimée.

A)

Protéine	% de cellules avec prolongements			
	0	1	2	>2
MAP2b	86,0 ±0,9	11,8 ±1,1	1,3 ±1,9	0,9 ±0,8
MAP2c	33,8 ±3,3	20,2 ±2,3	9,8 ±1,1	36,2 ±1,4
Mt	46,7 ±2,4	21,8 ±2,7	11,5 ±3,0	20,0 ±3,3

B)

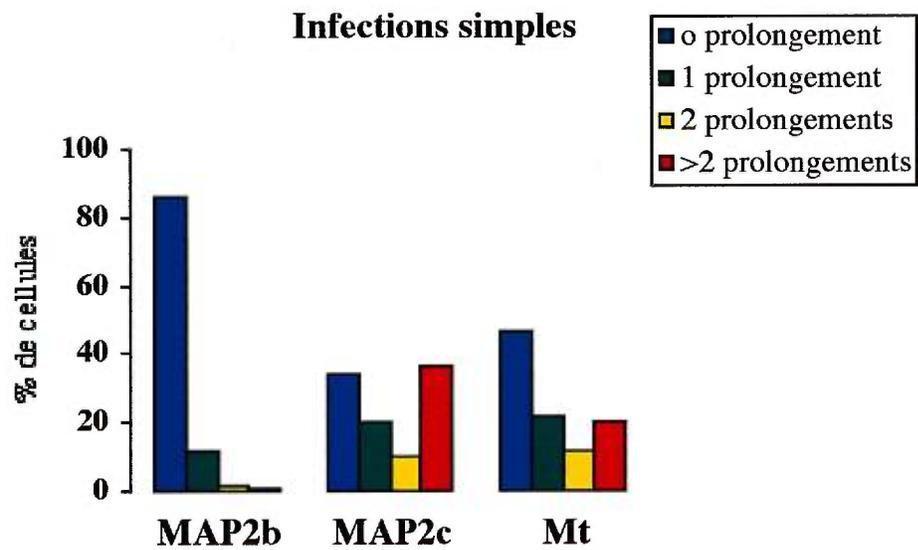
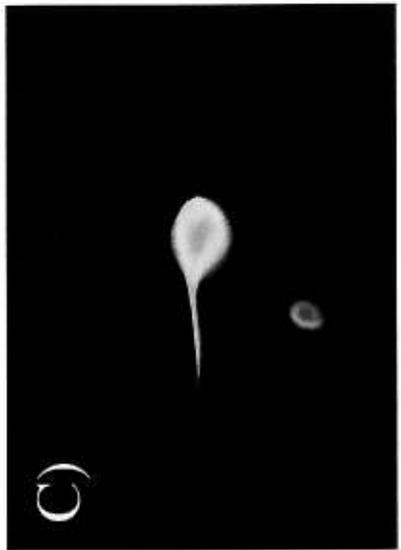
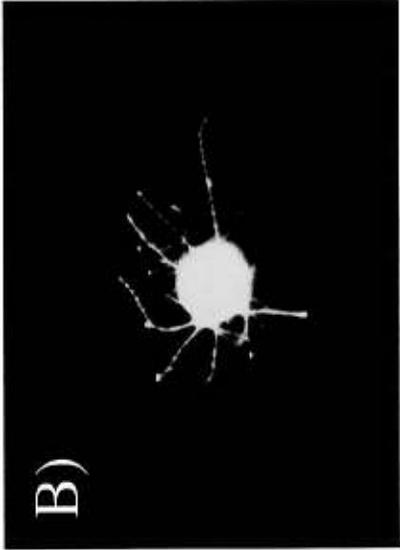
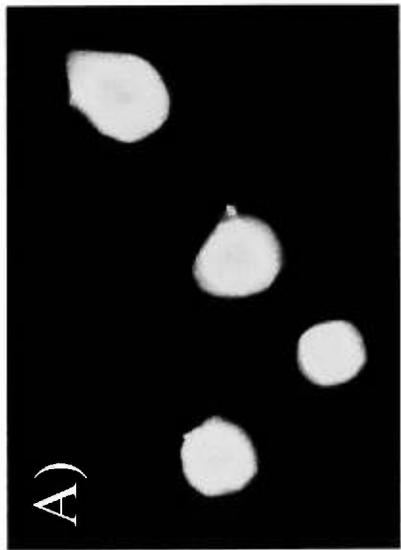


Figure 7: Micrographies illustrant les patterns de production de prolongements cytoplasmiques induits par l'expression, dans les cellules Sf9, des protéines MAP2b et MAP2c ou de leurs différents domaines fonctionnels. A) Prob. Le même phénotype est obtenu avec Proc. B) MAP2c. C) MAP2b. D) Mt. Les infections simples des cellules Sf9 ont été effectuées par Dave Bélanger dans le cadre de son projet de maîtrise. Le phénotype cellulaire observé servira de base pour la détermination du comportement dominant négatif des constructions de MAP2. Les cellules sont marquées en immunofluorescence avec l'anticorps HM2 contre MAP2.



domaines. L'expression de l'isoforme MAP2b n'induit l'élaboration de prolongements que dans 14 % des cellules infectées et ces cellules n'en produisent généralement qu'un seul. Au contraire, l'expression de l'isoforme MAP2c induit des prolongements dans 66,2 % des cellules Sf9 infectées, et plus de la moitié de ces cellules produisent plus de deux prolongements. L'isoforme MAP2c semble donc avoir un rôle plus prédominant que l'isoforme MAP2b dans la formation de prolongements cytoplasmiques multiples dans les cellules Sf9. Par contre, les cellules exprimant les domaines de projection des deux isoformes, Prob et Proc, ne développent aucun prolongement cytoplasmique, alors que l'expression du domaine de liaison aux microtubules induit la production de prolongement chez 53,3 % des cellules ainsi infectées. Les résultats de Bélanger et al. (en préparation) semblent assigner au domaine de liaison aux microtubules l'essentiel de la capacité de production de prolongements cytoplasmiques attribuée aux protéines MAP2b et MAP2c, alors que les domaines de projection de MAP2 joueraient un rôle régulateur sur cette capacité.

2.2. Effet dominant négatif :

Nous voulions surexprimer les protéines tronquées Prob, Proc et Mt dans les cellules EC P19, pour bloquer sélectivement la fonction des protéines complètes endogènes de ce système neuronal. Toutefois, il n'était pas exclu que la surexpression de ces protéines tronquées n'ait aucun effet sur la fonction des protéines endogènes. Avant d'exprimer nos constructions dans les cellules EC P19, nous avons donc voulu vérifier leur comportement dans un système plus simple, le système baculoviral. C'est pourquoi nous avons co-exprimé les protéines tronquées et les protéines complètes dans les

cellules Sf9, de manière à vérifier le comportement des protéines tronquées en présence des protéines complètes. Le pattern de production de prolongements cytoplasmiques étant connu pour chacune des constructions exprimées séparément, nous avons utilisé ces phénotypes de base pour examiner à l'aide de co-infections le comportement dominant négatif des protéines tronquées par rapport aux protéines complètes (voir section 2.1.). Nous avons augmenté progressivement la quantité relative de protéine tronquée par rapport à la quantité de protéine complète, pour déterminer si le phénotype induit par l'expression des protéines complètes pouvait être perturbé par l'expression des protéines tronquées. Bien que les phénotypes de base avec infection simple aient été observé après infection avec les virus à une MOI de 5, nous avons parfois infecté les cellule Sf9 avec des virus à une MOI de 10 lors des co-infections. La compétition entre les deux virus lors des co-infections nous a obligé à utiliser des MOIs plus élevées pour s'assurer que les cellules contiendraient les deux virus. Les expériences de Dave Bélanger, réalisées à des MOI de 0,5 à 10, ont montré que la MOI utilisée n'influençait pas le phénotype obtenu lors des infections simples.

2.2.1. Co-infection MAP2b/Mt :

Nous avons co-infecté les cellules Sf9 avec le virus MAP2b à une MOI de 10, et le virus Mt à des MOI de 0.5, 2.5 et 5. L'augmentation de la quantité relative de virus Mt était susceptible d'augmenter la quantité de cellules élaborant des prolongements cytoplasmiques dans les cellules co-infectées par les deux virus. Nous avons marqué les cellules en immunofluorescence avec les anticorps AP20 pour visualiser MAP2b et anti-6XHis pour visualiser Mt, et nous avons dénombré les cellules marquées par les deux anticorps (cf. Figures 8A et 9). On pouvait s'attendre à ce que le phénotype de formation

de prolongements induit par MAP2b soit perturbé par l'expression de Mt. De fait, l'augmentation de la quantité du virus Mt a provoqué une légère augmentation du nombre de cellules co-infectées émettant des prolongements. Le pourcentage de cellules co-infectées sans prolongements a baissé de 86,0 % ($\pm 0,9$) à 77,8 % ($\pm 5,5$), lorsqu'on est passé d'une infection par le virus Mt à une MOI de 0 à une MOI de 5. De la même manière, le pourcentage des cellules émettant un seul prolongement a augmenté légèrement, passant de 9,5 % ($\pm 2,2$) à 15,8 % ($\pm 3,2$), lorsqu'on a augmenté la MOI relative du virus Mt. L'augmentation de la quantité relative de virus Mt semblait donc modifier le phénotype induit par l'expression de MAP2b. Toutefois, cette modification n'était pas très marquée et à peine significative. Si la construction Mt semblait se comporter de façon dominante négative vis-à-vis de la protéine MAP2b, les résultats de co-infection n'étaient pas très concluants. Pour observer un changement phénotypique important lors de la co-infection MAP2b/Mt, il faudrait sans doute infecter les cellules Sf9 avec le virus Mt à une MOI plus élevée.

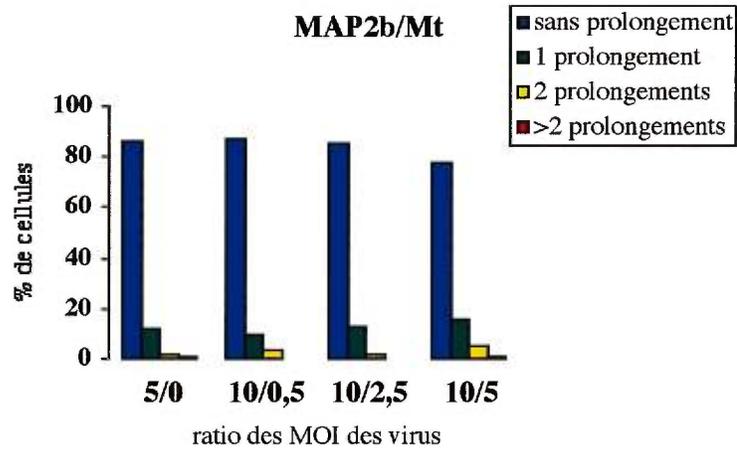
2.2.2. Co-infection MAP2b/Prob :

Nous avons co-infecté les cellules Sf9 avec le virus MAP2b à une MOI de 10 et le virus Prob à des MOI de 0.5, 2.5 et 5. L'augmentation de la quantité relative de virus Prob était susceptible de diminuer le pourcentage des cellules élaborant des prolongements cytoplasmiques dans les cellules co-infectées par les deux virus. Le phénotype cellulaire induit par la co-infection devait aussi se rapprocher progressivement du phénotype induit par l'infection par le virus Prob seul. Nous avons marqué les cellules co-infectées avec les anticorps 46.1 pour visualiser MAP2b et 6XHis pour visualiser Prob, et nous avons dénombré les cellules marquées avec les deux

Figure 8 : Comportement dominant négatif des constructions Prob et Mt dans les cellules Sf9 exprimant MAP2b. A) Tableau et histogramme illustrant la comparaison du phénotype induit par co-infection avec les virus MAP2b et Mt à différents ratios de MOI par rapport au phénotype induit par MAP2b seul. (n=3). B) Tableau et histogramme illustrant la comparaison du phénotype induit par co-infection avec les virus MAP2b et Prob à différents ratios de MOI par rapport au phénotype induit par MAP2b seul. (n=3). Les cellules sont réparties selon leur capacité à élaborer 0,1, 2 ou plus de 2 prolongements. Nous avons inclus, à titre indicatif, les résultats obtenus par Dave Bélanger lors de l'infection par le virus MAP2b seul.

A)

MAP2b/Mt	% de cellules avec prolongements			
	0	1	2	>2
5/0	86,0 ±0,9	11,8 ±1,1	1,3 ±1,9	0,9 ±0,8
10/0,5	87,1 ±4,1	9,5 ±2,2	3,1 ±2,1	0,2 ±0,3
10/2,5	85,1 ±3,2	12,9 ±1,9	2,0 ±1,4	0 ±0
10/5	77,8 ±5,5	15,8 ±3,2	5,3 ±2,9	1,1 ±0,3



B)

MAP2b/Prob	% de cellules avec prolongements			
	0	1	2	>2
5/0	86,0 ±0,9	11,8 ±1,1	1,3 ±1,9	0,9 ±0,8
10/0,5	89,8 ±5,7	8,9 ±4,7	1,1 ±1,1	0,2 ±0,3
10/2,5	92,7 ±4,3	6,0 ±3,8	1,3 ±0,5	0 ±0
10/5	91,8 ±3,0	6,9 ±2,5	1,1 ±0,3	0,2 ±0,3

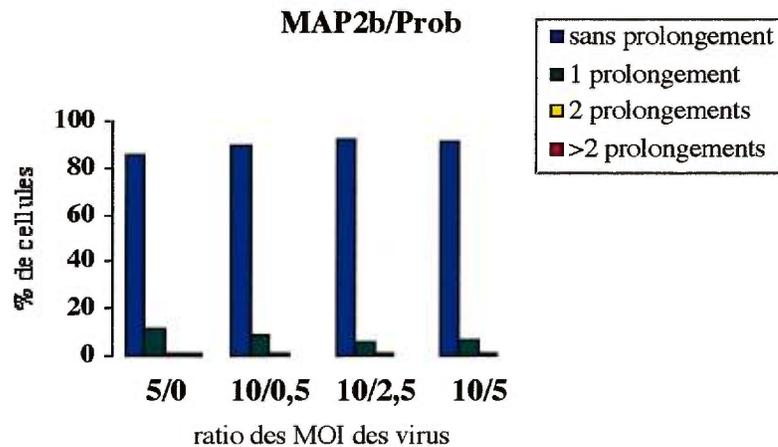


Figure 9: Micrographies illustrant l'effet dominant négatif des domaines Prob et Mt sur MAP2b obtenu par co-infection des cellules Sf9. Les cellules sont co-infectées avec les virus MAP2b et Mt et avec les virus MAP2b et Prob à différents ratios de MOI. L'augmentation progressive de la quantité relative de virus Mt augmente la quantité de cellules élaborant plusieurs prolongements. L'augmentation de la quantité relative de virus Prob ne provoque aucun changement significatif du phénotype des cellules exprimant MAP2b. Marquage des cellules en immunofluorescence avec un anticorps contre l' α -tubuline.

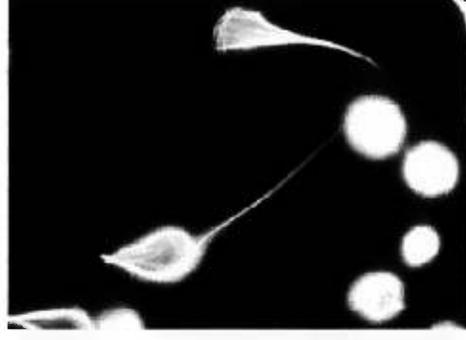
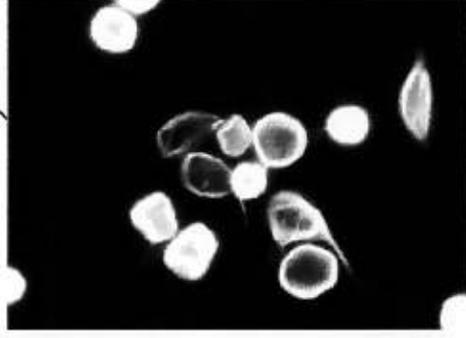
M.O.I.:

10/0,5

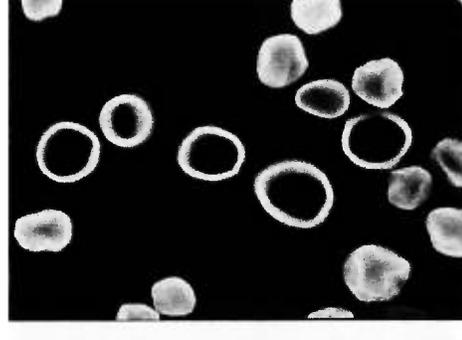
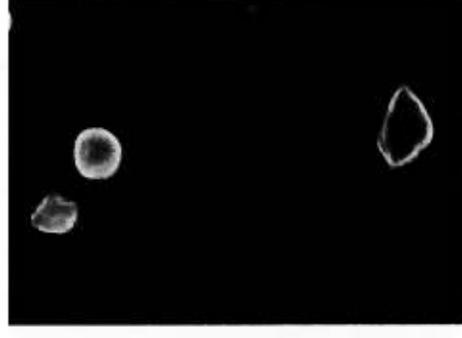
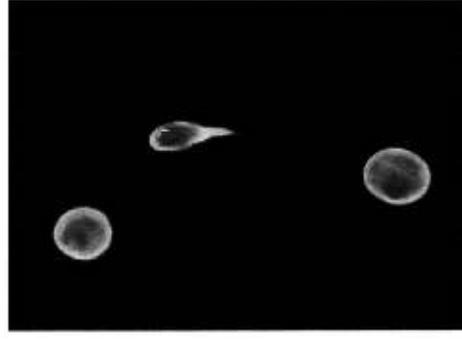
10/2,5

10/5

MAP2b/Mit



MAP2b/Prob



anticorps. Nous n'avons observé aucun changement significatif dans le pourcentage de cellules élaborant des prolongements lorsque nous avons augmenté la quantité relative de virus Prob par rapport au virus MAP2b (cf. Figures 8B et 9). La construction Prob ne semblait donc pas se comporter de façon dominante négative vis-à-vis de la protéine MAP2b. La grande variabilité entre les résultats des différentes expériences de co-infection avec ces deux virus a pu masquer une modification du phénotype induit lors de l'augmentation relative du virus Prob. Des différences dans la capacité d'infection des deux virus peuvent également avoir été à l'origine de ce résultat négatif. Une différence plus importante entre les MOI des deux virus devraient permettre de valider la présence ou l'absence d'un comportement dominant négatif.

2.2.3. Co-infection MAP2c/Mt :

Nous avons co-infecté les cellules Sf9 avec les virus MAP2c et Mt à des MOI relatives de 2.5/5, 5/5 et 5/2.5. L'expression de la protéine MAP2c induit l'élaboration de plus de deux prolongements dans 36 % des cellules infectées. L'expression de la protéine Mt induit l'élaboration de plus de deux prolongements dans seulement 20 % des cellules (Bélanger et al., en préparation). Nous nous attendions donc à ce que l'augmentation relative de la quantité du virus Mt dans les cellules co-infectées provoque une baisse du nombre de cellules élaborant plus de deux prolongements. Nous avons marqué les cellules co-infectées avec les anticorps anti-myc pour visualiser la protéine MAP2c et anti-6Xhis pour visualiser la protéine Mt, et nous avons dénombré les cellules marquées avec les deux anticorps. Lorsque nous avons co-infecté les cellules Sf9 avec MAP2c et Mt, nous avons observé une baisse significative de la quantité de cellules élaborant plus de deux prolongements par rapport aux cellules infectées avec

MAP2c seul (cf. Figures 10A et 11). Le pourcentage de cellules élaborant plus de deux prolongements est passé de 36,2 % ($\pm 1,4$) dans les cellules infectées avec MAP2c seul à 4,2 % ($\pm 2,2$), 3,8 % ($\pm 1,9$) et 4,7 % ($\pm 2,7$) dans les cellules co-infectées avec MAP2c et Mt. Cette baisse a provoqué en contrepartie chez les cellules co-infectées une augmentation significative du nombre de cellules élaborant un seul prolongement par rapport aux cellules infectées avec MAP2c seul. Le pourcentage de cellules élaborant un seul prolongement est passé de 20,2 % ($\pm 2,3$) à 41,1 % ($\pm 3,6$), 46,6 % ($\pm 2,5$) et 44,4 % ($\pm 1,1$) dans les cellules co-infectées. La grande variabilité entre les différentes expériences lors de ces co-infections n'a pas permis d'observer un effet additif sur la formation de prolongements lors de l'augmentation de la quantité relative du virus Mt.

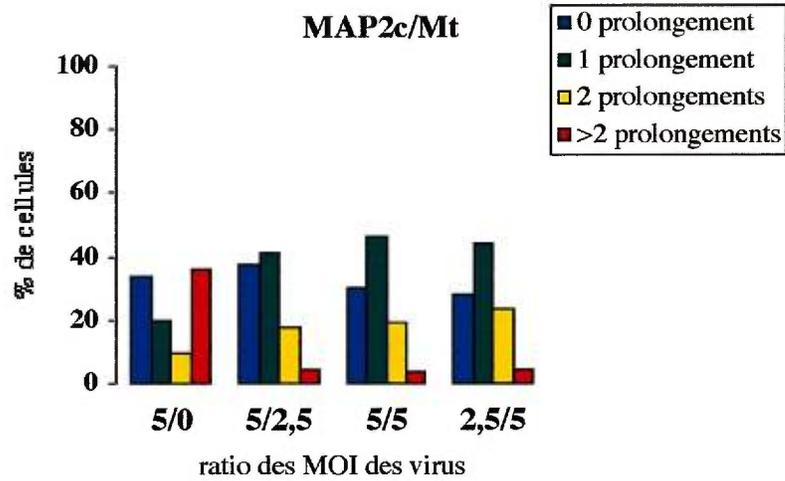
2.2.4. Co-infection MAP2c/Proc :

Nous avons co-infecté les cellules Sf9 avec les virus MAP2c et Proc à des MOI relatives de 2.5/5, 5/5 et 5/2.5. L'augmentation de la quantité relative de virus Proc était susceptible de provoquer une diminution du pourcentage des cellules élaborant des prolongements cytoplasmiques dans les cellules co-infectées par les deux virus. Nous avons marqué les cellules co-infectées en immunofluorescence avec les anticorps anti-myc pour visualiser MAP2c et anti-6XHis pour visualiser Proc, et nous avons dénombré les cellules marquées avec les deux anticorps (cf. Figures 10B et 11). L'augmentation relative de la quantité du virus Proc a provoqué une augmentation significative du pourcentage de cellules sans prolongements lors de la co-infection avec un ratio de 2,5/5 ainsi qu'une baisse significative du pourcentage de cellules élaborant 2 prolongements ou plus. Le pourcentage de cellules qui élaborent deux prolongements est passé de 27,1 % ($\pm 8,1$) lorsque le ratio MAP2c/Proc est de 5/2,5 à 7,6 % ($\pm 4,1$) lorsque le ratio est

Figure 10 : Comportement dominant négatif des constructions Proc et Mt dans les cellules Sf9 exprimant MAP2c. A) Tableau et histogramme illustrant la comparaison du phénotype induit par co-infection avec les virus MAP2c et Mt à différents ratios de MOI par rapport au phénotype induit par MAP2c seul. (n=3). B) Tableau et histogramme illustrant la comparaison du phénotype induit par co-infection avec les virus MAP2c et Proc à différents ratios de MOI par rapport au phénotype induit par MAP2c seul. (n=3) Les cellules sont réparties selon leur capacité à élaborer 0,1, 2 ou plus de 2 prolongements dans les cellules Sf9. Nous avons inclus, à titre indicatif, les résultats obtenus par Dave Bélanger lors de l'infection par le virus MAP2c seul.

A)

MAP2c/Mt	% de cellules avec prolongements			
	0	1	2	>2
5/0	33,8 ±3,3	20,2 ±2,3	9,8 ±1,1	36,2 ±1,4
5/2,5	37,3 ±6,6	41,1 ±3,6	17,3 ±7,7	4,2 ±2,2
5/5	30,4 ±7,1	46,6 ±2,5	19,1 ±5,1	3,8 ±1,9
2,5/5	27,6 ±9,2	44,4 ±1,1	23,3 ±5,7	4,7 ±2,7



B)

MAP2c/Proc	% de cellules avec prolongements			
	0	1	2	>2
5/0	33,8 ±3,3	20,2 ±2,3	9,8 ±1,1	36,2 ±1,4
5/2,5	29,1 ±9,5	33,3 ±4,9	27,1 ±8,1	10,4 ±6,3
5/5	31,1 ±6,0	37,3 ±2,4	24,4 ±4,4	7,1 ±3,3
2,5/5	63,5 ±12,1	28,2 ±7,5	7,6 ±4,1	0,6 ±0,5

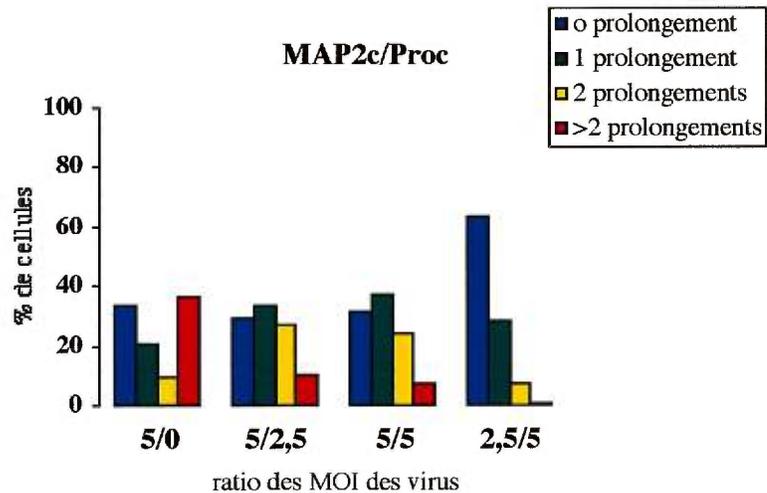


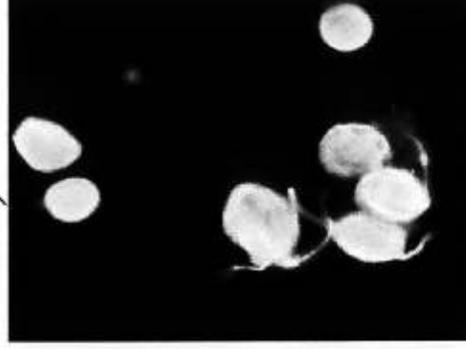
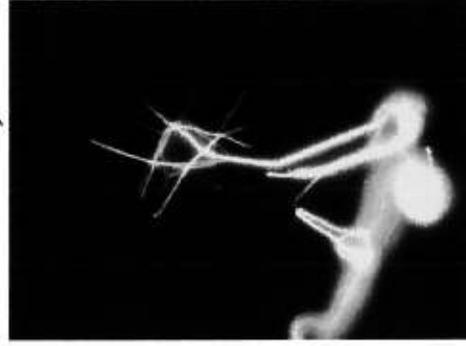
Figure 11: Micrographies illustrant l'effet dominant négatif des domaines Proc et Mt sur MAP2c obtenu par co-infection des cellules Sf9. Les cellules sont co-infectées avec les virus MAP2c et Mt et avec les virus MAP2c et Proc à différents ratios de MOI. L'augmentation de la quantité relative de virus Proc et Mt modifie le phénotype cellulaire induit par le virus MAP2c. Marquage des cellules en immunofluorescence avec un anticorps contre l' α -tubuline.

M.O.I.:

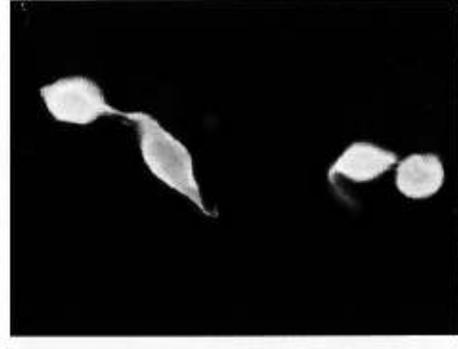
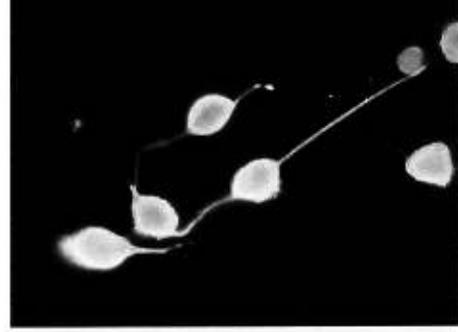
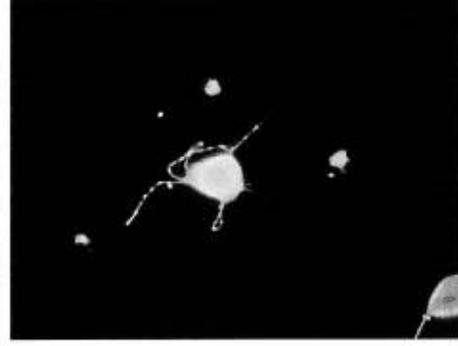
5/2,5

5/5

2,5/5



MAP2c/Mt



MAP2c/Proc

inversé à 2,5/5. De même, le pourcentage des cellules élaborant plus de deux prolongements est passé de 10,4 % ($\pm 6,3$) à 0,6 % ($\pm 0,5$). À l'opposé, le pourcentage de cellules sans prolongements s'est accru significativement, passant de 29,1 % ($\pm 9,5$) lorsque MAP2c était majoritaire avec un ratio de 5/2,5 à 63,5 % ($\pm 12,1$) lorsque Proc était majoritaire avec un ratio de 2,5/5. La protéine tronquée Proc semble donc s'être comportée de façon dominante négative vis-à-vis de la protéine MAP2c et avoir perturbé le phénotype induit par l'expression de la protéine MAP2c.

Les résultats décrits plus hauts suggéraient que les constructions Proc et Mt avaient un comportement dominant négatif face à la protéine MAP2c, car elles pouvaient perturber le phénotype induit par l'expression de MAP2c. La construction Prob ne semblait pas se comporter comme un dominant négatif face à MAP2b et la construction Mt n'a pas montré d'effet perturbateur sur le phénotype induit par MAP2b. Nous n'avons toutefois pas vérifié par immunobuvardage que le taux d'expression des protéines était proportionnel aux MOI utilisées. Nous avons surexprimé à la fois les protéines tronquées et les protéines complètes dans les cellules Sf9 pour obtenir un phénotype cellulaire. Cette double surexpression a pu masquer un effet dominant négatif. Dans les cellules EC P19, nous ne surexprimons qu'une protéine à la fois, ce qui pourrait augmenter l'effet obtenu. Le système baculoviral est également fort différent du système neuronal que nous voulons étudier. Il est donc possible que toutes les constructions se comportent en dominants négatifs dans le système neuronal EC P19. Nous avons donc transféré les constructions dans un vecteur d'expression eucaryote.

2.3. Spécificité des domaines de MAP2 :

Nous avons également co-infecté les cellules Sf9 avec les virus des domaines de projection Prob et Proc combinés aux virus exprimant les protéines MAP2c et MAP2b complètes. La co-infection avec les combinaisons de virus MAP2b/Proc et MAP2c/Prob a permis d'explorer si l'effet d'un domaine de projection est spécifique sur la protéine complète correspondante. Nous avons marqué les cellules co-infectées avec les virus MAP2b et Proc avec les anticorps AP20 pour visualiser MAP2b et anti-6XHis pour visualiser Proc, et les cellules co-infectées avec les virus MAP2c et Prob avec les anticorps anti-myc et AP20. Nous avons ensuite dénombré les cellules marquées avec les deux anticorps correspondants.

La co-infection des cellules avec les virus MAP2b et Proc a montré une légère augmentation du pourcentage de cellules élaborant des prolongements, concomitante à l'augmentation de la quantité relative de virus Proc (cf. Figure 12A). Le pourcentage de cellules élaborant un prolongement est passé de 5,8 % ($\pm 2,3$) pour un ratio de 10/0,5 à 8,9 % ($\pm 3,2$) pour un ratio de 10/5. Cette augmentation très légère n'était toutefois pas statistiquement significative. L'expression de la construction Proc n'a pas significativement modifiée le phénotype induit par MAP2b seul.

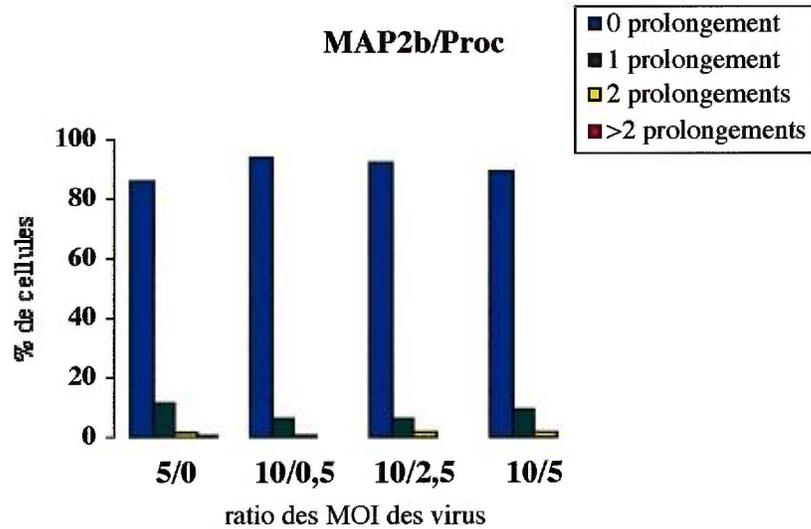
À l'inverse, la co-infection des cellules Sf9 avec les virus MAP2c et Prob a montré une baisse significative du nombre de cellules élaborant des prolongements multiples par rapport aux cellules infectées avec le virus MAP2c seul (cf. Figure 12B). Le pourcentage de cellules élaborant plus de deux prolongements est passé de 36,2 % ($\pm 1,4$) pour les cellules infectées avec MAP2c seul à 7,6 % (2,5), 9,3 % ($\pm 4,7$) et 4,0 % ($\pm 1,4$) pour les cellules co-infectées avec MAP2c et Prob. Le pourcentage de cellules

Figure 12 : Quantification des co-infections pour vérifier la spécificité et la coopérativité des différents domaines de MAP2 dans les cellules Sf9. A) Tableau et histogramme illustrant le changement de phénotype cellulaire obtenu par co-infection des virus MAP2b et Proc à différents ratios de MOI dans les cellules Sf9. B) Tableau et histogramme illustrant le changement de phénotype cellulaire obtenu par co-infection des virus MAP2c et Prob à différents ratios de MOI dans les cellules Sf9. C) Tableau et histogramme illustrant le changement de phénotype cellulaire obtenu par co-infection des virus Prob et Mt à différents ratios de MOI dans les cellules Sf9. D) Tableau et histogramme illustrant le changement de phénotype cellulaire obtenu par co-infection des virus Proc et Mt à différents ratios de MOI dans les cellules Sf9.

Les cellules sont réparties selon leur capacité à élaborer 0,1, 2 ou plus de 2 prolongements dans les cellules Sf9. (n=3). Nous avons inclus, à titre indicatif, les résultats obtenus par Dave Bélanger lors de l'infection des cellules Sf9 par les virus recombinants. En A, nous avons inclus les résultats de l'infection par le virus MAP2b, en B, par le virus MAP2c et en C et D, par le virus Mt.

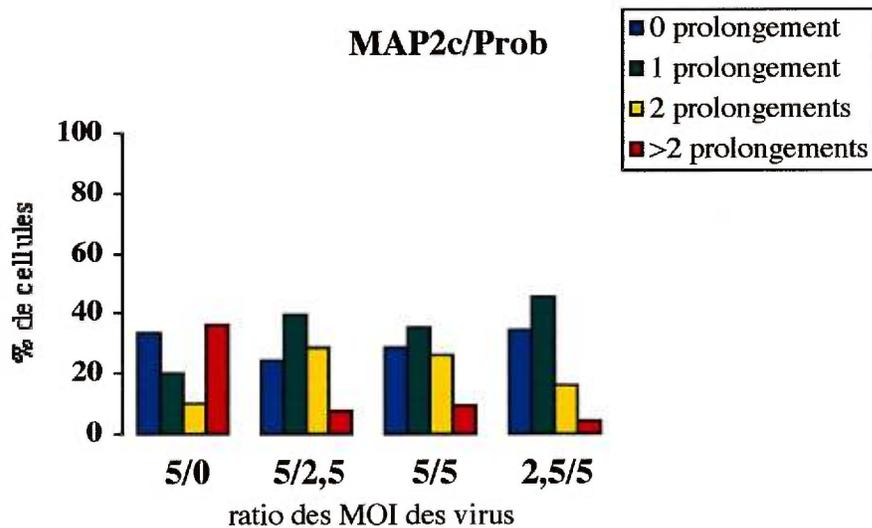
A)

MAP2b/Proc	% de cellules avec prolongements			
	0	1	2	>2
5/0	86,0 ±0,9	11,8 ±1,1	1,3 ±1,9	0,9 ±0,8
10/0,5	93,8 ±2,5	5,8 ±2,3	0,4 ±0,6	0,0 ±0
10/2,5	92,0 ±1,6	6,2 ±1,1	1,8 ±0,7	0,0 ±0
10/5	89,3 ±4,3	8,9 ±3,2	1,8 ±1,1	0,0 ±0



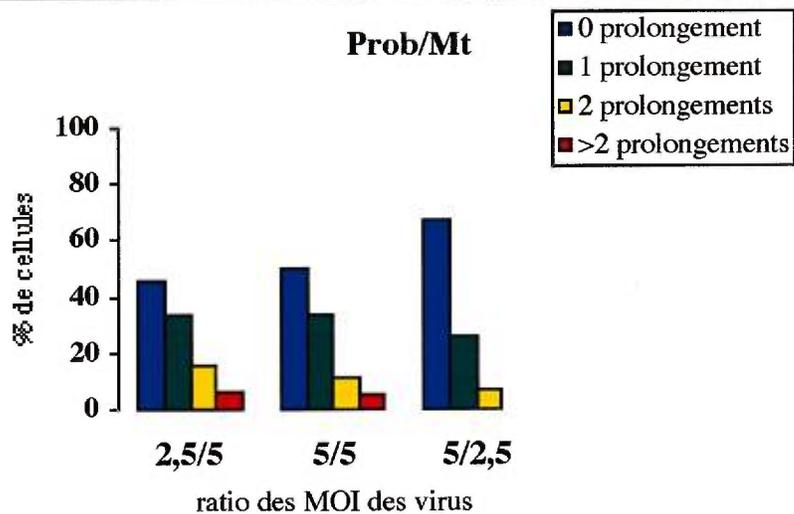
B)

MAP2c/Prob	% de cellules avec prolongements			
	0	1	2	>2
5/0	33,8 ±3,3	20,2 ±2,3	9,8 ±1,1	36,2 ±1,4
5/2,5	24,7 ±5,8	39,1 ±3,5	28,7 ±4,2	7,6 ±2,5
5/5	28,9 ±7,1	35,6 ±2,6	26,2 ±4,9	9,3 ±4,7
2,5/5	34,7 ±8,6	45,6 ±6,8	15,8 ±2,6	4,0 ±1,4



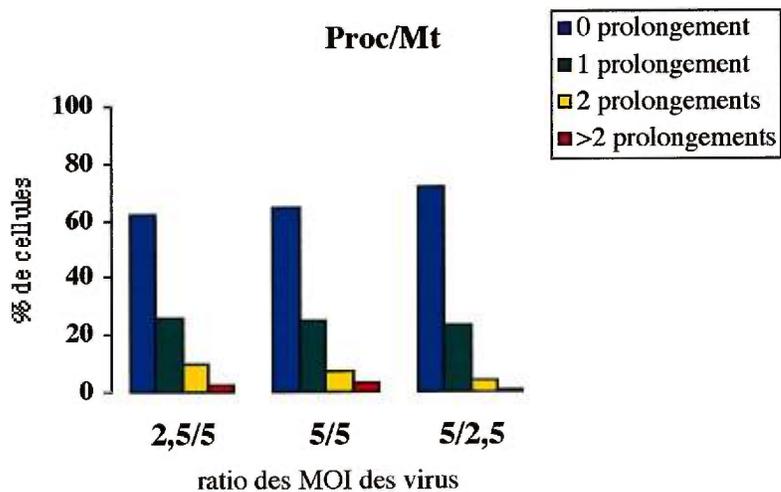
C)

Prob/Mt	% de cellules avec prolongements			
	0	1	2	>2
0/5	46,7 ±2,4	21,8 ±2,7	11,5 ±3,0	20,0 ±3,3
2,5/5	45,3 ±6,9	33,3 ±8,7	15,3 ±0,9	6,0 ±2,4
5/5	50,2 ±3,6	34,0 ±4,8	10,9 ±2,2	4,9 ±0,6
5/2,5	67,1 ±1,9	25,6 ±3,2	6,9 ±1,1	0,4 ±0,6



D)

Proc/Mt	% de cellules avec prolongements			
	0	1	2	>2
0/5	46,7 ±2,4	21,8 ±2,7	11,5 ±3,0	20,0 ±3,3
2,5/5	62,4 ±5,4	26,0 ±7,3	9,3 ±4,7	2,2 ±0,8
5/5	64,4 ±4,4	25,3 ±1,5	7,3 ±4,4	2,9 ±1,9
5/2,5	72,0 ±3,6	23,1 ±1,1	4,0 ±1,6	0,9 ±0,8



élaborant un seul prolongement a au contraire augmenté de façon significative, passant de 20,2 % ($\pm 2,3$) pour les cellules infectées avec MAP2c seulement à 39,1 % ($\pm 3,5$), 35,6 % ($\pm 2,6$) et 45,6 % ($\pm 6,8$) pour les cellules co-infectées. La grande variabilité entre les différentes expériences lors de ces co-infections n'a pas permis de discerner d'effet additif sur la formation de prolongements lors de l'augmentation de la quantité relative du virus Prob. Toutefois, la protéine Prob semble pouvoir exercer une fonction régulatrice négative sur la capacité de MAP2c à induire la formation de prolongements cytoplasmiques multiples dans les cellules Sf9.

2.4. Coopérativité des domaines de MAP2 :

En plus de vérifier le comportement des constructions dans un contexte de dominant négatif, nous avons utilisé la co-infection des cellules Sf9 pour vérifier la coopérativité des deux domaines de MAP2. L'infection des cellules Sf9 avec les combinaisons de virus Prob/Mt et Proc/Mt avait pour but de déterminer s'il est nécessaire que les deux domaines soient physiquement liés pour donner le phénotype cellulaire obtenu avec les protéines complètes.

Nous avons co-infecté les cellules Sf9 avec les virus Prob et Mt en faisant varier le ratio des MOI des deux virus. Nous avons marqué les cellules co-infectées avec les anticorps AP20 pour visualiser Prob et 46.1 pour visualiser Mt, et nous avons dénombré les cellules marquées avec les deux anticorps. Le phénotype cellulaire obtenu a varié en fonction de la quantité relative des deux virus Prob et Mt (cf. Figure 12C). Le pourcentage de cellules n'élaborant aucun prolongement a augmenté significativement avec l'augmentation relative du virus Prob, passant de 45,3 % ($\pm 6,9$) pour un ratio de

2,5/5 à 67,1 % ($\pm 1,9$) pour un ratio de 5/2,5. Le pourcentage de cellules élaborant plus de deux prolongements a baissé de manière significative, passant de 6,0 % ($\pm 2,4$) pour un ratio de 2,5/5 à 0,4 % ($\pm 0,6$) pour un ratio de 5/2,5. Il semble donc que plus la quantité de protéine Prob augmente, moins la protéine Mt semble contribuer à l'élaboration de prolongements multiples dans les cellules Sf9.

Nous avons également co-infecté les cellules Sf9 avec les virus Proc et Mt en faisant varier le ratio des MOI des deux virus. Ces cellules ont été marquées avec les anticorps HM2 pour visualiser Proc et 46.1 pour visualiser Mt, et nous avons dénombré les cellules marquées avec les deux anticorps (cf. Figure 12D). L'augmentation relative du virus Proc a provoqué une augmentation significative du pourcentage de cellules sans prolongements. Celui-ci est passé de 46,7 % ($\pm 2,4$) lorsque les cellules Sf9 ont été infectées avec Mt seul à 62,4 % ($\pm 5,4$), 64,4 % ($\pm 4,4$) et 72,0 % ($\pm 3,6$) lors de la co-infection avec Proc et Mt. Le pourcentage de cellules élaborant plus de deux prolongements a significativement baissé, passant de 20,0 % ($\pm 3,3$) lors de l'infection par Mt à 2,2 % ($\pm 0,8$), 2,9 % ($\pm 1,9$) et 0,9 % ($\pm 0,8$) lors de la co-infection Proc/Mt à des ratios de 2,5/5, 5/5 et 5/2,5. La grande variabilité entre les différentes expériences lors de ces co-infections n'a pas permis de constater d'effet inhibiteur additif sur la formation de prolongements lors de l'augmentation de la quantité relative du virus Proc.

Ces résultats semblent indiquer que les deux domaines de projection Prob et Proc auraient un effet régulateur négatif sur la capacité de formation de prolongements cytoplasmiques du domaine de liaison aux microtubules Mt. Le domaine de projection n'aurait pas besoin d'être physiquement lié au domaine de liaison aux microtubules pour réguler sa capacité à élaborer des prolongements.

3. Transfert des constructions au vecteur d'expression eucaryote :

Après vérification de leur comportement dans les cellules Sf9, les différentes constructions de MAP2 ont été insérées dans le vecteur d'expression eucaryote pKJ1ΔF pour être exprimées dans les cellules EC P19.

Nous avons sélectionné une approche de co-transfection pour l'expression des protéines dans le système des cellules EC P19. Nous avons transfecté les cellules avec le vecteur de sélection pPGKPuro (gracieusement offert par le Dr. St-Arnaud) qui donne aux cellules une résistance à la puromycine (cf. Figure 3B). Les cellules ont également été transfectées avec le vecteur d'expression pKJ1ΔF (gracieusement offert par le Dr. McBurney) contenant les constructions de MAP2 à exprimer (cf. Figure 3C). Ces deux vecteurs contiennent le promoteur et le signal de polyadénylation du gène de la kinase phosphoglycérate, lequel est exprimé dans tous les types cellulaires, y compris les cellules nerveuses (McBurney et al., 1994).

4. Expression des constructions de MAP2 dans le système EC P19 :

Pour exprimer nos constructions dans le système EC P19, nous avons dû établir des lignées stables de cellules transfectées. Les transfactions transitoires permettent une expression des protéines encodées par l'ADN transfecté pendant quelques jours seulement. Comme nous voulions vérifier l'action des protéines mutantes sur les neurones issus des cellules EC P19, il nous fallait induire la différenciation de ces cellules pendant quatre jours et leur permettre de se différencier pendant encore deux à

cinq jours. Il nous fallait donc transfecter les cellules EC P19 de façon stable pour garder l'expression des protéines mutantes le temps nécessaire.

4.1. Mise au point de la co-transfection avec la GFP :

Avant d'exprimer les constructions de MAP2 dans les cellules EC P19, nous avons déterminé la concentration de puromycine à ajouter dans le milieu de culture pour sélectionner efficacement les cellules ayant développé la résistance à cet antibiotique par suite de leur transfection. À cette fin, nous avons établi une courbe dose-réponse à la puromycine, permettant de connaître la concentration minimale requise pour tuer 100 % des cellules non résistantes. Des cellules EC P19 ont été soumises à des concentrations de puromycine de 0.5, 1, 1.5, 2, 5, 10 et 50 $\mu\text{g/ml}$. Tel qu'indiqué dans la littérature, une concentration finale de 2 $\mu\text{g/ml}$ s'est avérée suffisante pour éliminer 100 % des cellules. Nous avons donc sélectionné les cellules résistantes en ajoutant la puromycine à cette concentration finale.

Avant d'introduire les constructions dans les cellules EC P19, nous avons essayé la technique de co-transfection avec un vecteur codant pour la Protéine Fluorescente Verte (GFP). Nous avons testé l'efficacité du composé non-lipidique FuGene 6 (Roche) dans la co-transfection, avec un mélange de 2 μg d'ADN pPGKPuro et 8 μg d'ADN GFP et un mélange de 2 μg d'ADN pPGKPuro et 10 μg d'ADN GFP. Ces ratios ADN de sélection/ADN d'expression ont déjà été utilisés avec succès dans la littérature. Nous nous sommes ainsi assurés que la grande majorité des cellules ayant incorporé le vecteur de sélection incorporeraient également le vecteur d'expression. Les cellules EC P19 résistantes à la puromycine ont été induites en neurones pour vérifier que la co-

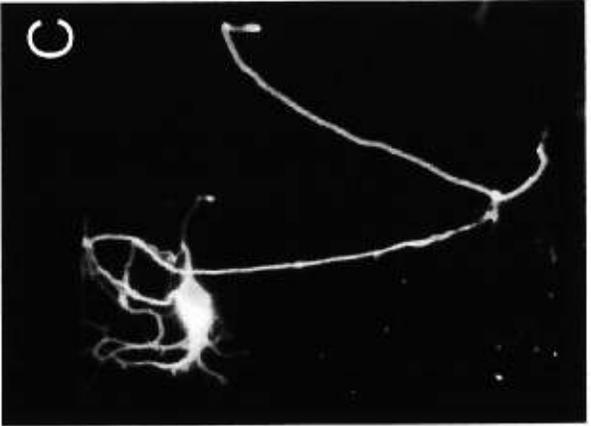
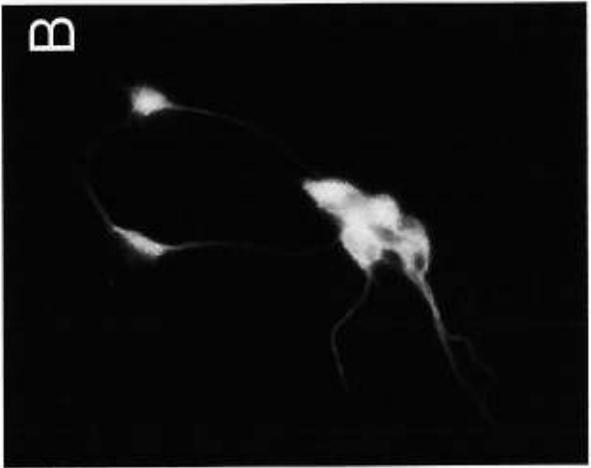
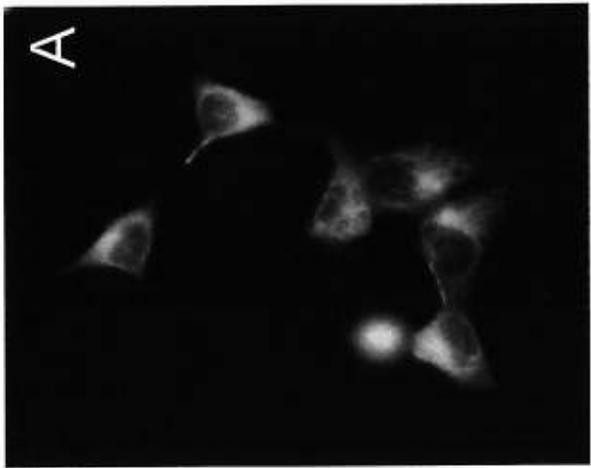
transfection n'interférait pas avec les processus d'induction et de différenciation neuronale. Les neurones issus des cellules EC P19 co-transfectées ont exprimé la protéine GFP et sont apparues morphologiquement normales. L'utilisation du ratio ADN de sélection/ADN d'expression de 2/8 ayant semblé induire le moins de mort cellulaire, nous avons privilégié l'utilisation de ce ratio lors des co-transfections des constructions MAP2.

4.2. Co-transfection des constructions de MAP2 dans le système neuronal EC P19 :

Nous avons essayé de co-transfecter les constructions de MAP2 et le gène de résistance à la puromycine dans les cellules EC P19. Les cellules EC P19 peuvent être transfectées de façon stable, mais les clones ainsi générés perdent facilement le transgène (Schmidt-Kastner et al., 1996). Toute lignée clonale élaborée doit donc être analysée immédiatement après fabrication. Nous avons ainsi pu générer une série de transfections avec chacune des constructions de MAP2 pour produire les lignées de cellules P19-MAP2b, P19-MAP2c, P19-Prob, P19-Proc et P19-Mt dérivées de la lignée EC P19. Comme contrôle de transfection, nous avons utilisé les cellules EC P19 non-transfectées (cf. Figure 13), les essais de transfection avec l'ADN GFP n'ayant révélé aucune anomalie dans le comportement des cellules EC P19 transfectées par rapport aux cellules normales.

Cette série de transfection a induit un changement de phénotype cellulaire pour certaines constructions. Lors des essais de transfection subséquents, nous n'avons pas pu générer des lignées cellulaires qui induisaient un phénotype cellulaire différent de celui

Figure 13: Micrographies illustrant le phénotype des cellules contrôles EC P19. A) Cellules contrôles non induites. B) Cellules contrôles EC P19 induites à l'acide rétinoïque, après 2 jours en culture. C) Cellules contrôles EC P19 induites à l'acide rétinoïque, après 5 jours en culture. Les cellules sont marquées avec un anticorps contre l' α -tubuline.



des cellules contrôles. Nous n'avons pas réussi non plus à montrer que les lignées cellulaires générées exprimaient bien les constructions de MAP2 insérées. Les essais d'immunobuvardage avec les anticorps contre l'épitope 6XHis ou contre MAP2 n'ont pas donné de résultats. Il serait important de tester à nouveau les transfections pour vérifier que les changements phénotypiques obtenus étaient bien dus à l'expression des mutants de MAP2 de façon à pouvoir valider les résultats préliminaires obtenus.

4.2.1. Cellules non induites :

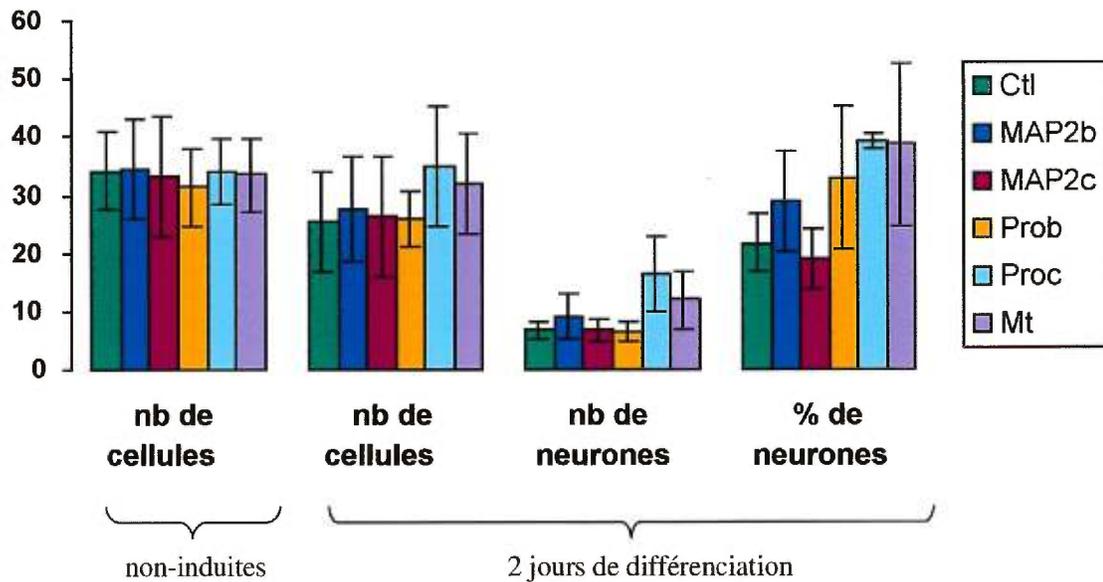
Une fois les lignées clonales constituées, nous avons examiné les cellules avant d'induire leur différenciation en neurones. Nous avons vérifié si l'expression des constructions de MAP2 pouvait avoir altéré leur rythme de division en ensemençant des pétris avec un nombre égal de cellules que nous avons fixées 24 heures après et marquées par immunofluorescence. Nous avons examiné le cytosquelette des cellules avec un marquage contre l' α -tubuline et l'actine. Aucune modification dans la distribution des microtubules ou des microfilaments d'actine n'a été remarquée par immunocytochimie entre les cellules contrôles et les cellules transfectées. Nous avons dénombré les cellules marquées contre l' α -tubuline et comprises dans un rectangle de 1,575 mm² (cf. Figure 14A). Les cellules étaient morphologiquement normales et leur rythme de division ne semblait pas avoir été altéré par la transfection. Nous avons tenté de visualiser l'expression des protéines recombinantes en marquant les cellules avec les anticorps contre l'épitope 6XHis et les anticorps AP-20, HM2 ou AP-305 contre MAP2. Le marquage est resté diffus et non-spécifique malgré les efforts déployés. Nous n'avons donc pas pu contrôler par immunofluorescence l'expression des transgènes dans les lignées cellulaires.

Figure 14 : Quantification du phénotype obtenu dans les cellules EC P19 après deux jours de différenciation. A) Tableau et histogramme illustrant l'analyse de la densité cellulaire des cellules EC P19 transfectées pour vérifier l'impact de MAP2 sur le contrôle du cycle cellulaire. Nous avons quantifié les neurones présents dans les cultures en marquant les cellules avec l'anticorps AP-20 contre MAP2 et selon la morphologie des cellules. (n=10). B) Tableau et histogramme illustrant le rôle de MAP2 dans l'élaboration des prolongements neuronaux dans les cellules EC P19. Quantification du pourcentage de cellules élaborant des prolongements neuronaux en fonction de la construction de MAP2 exprimée.

A)

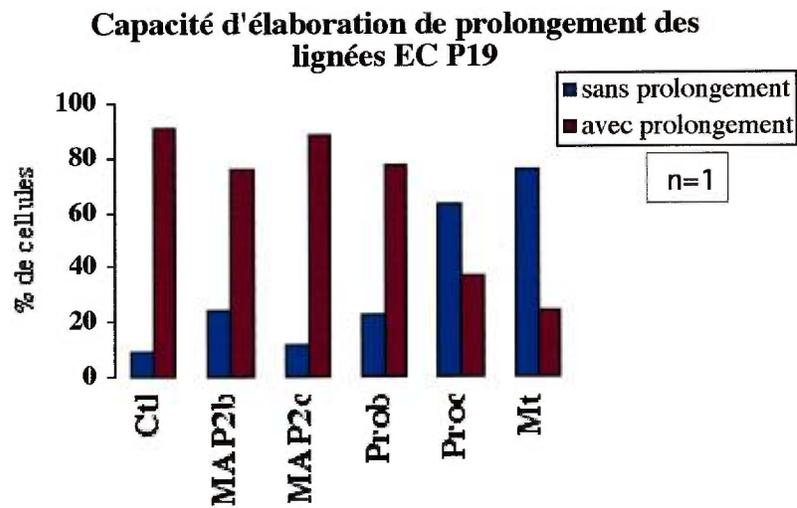
	non-induites		2 jours de différenciation	
	nb de cellules	nb de cellules	nb de neurones	% de neurones
Ctl	34,3 ±6,8	25,5 ±8,7	6,8 ±1,6	21,7 ±4,9
MAP2b	34,5 ±8,7	27,6 ±9,1	9,0 ±4,0	28,9 ±8,6
MAP2c	33,1 ±10,3	26,3 ±10,4	6,7 ±2,1	19,0 ±5,1
Prob	31,3 ±6,5	25,9 ±4,9	6,4 ±1,6	33,0 ±12,4
Proc	34,1 ±5,6	35,0 ±10,3	16,4 ±6,6	39,4 ±13,2
Mt	33,6 ±6,3	31,9 ±8,7	11,9 ±4,9	38,7 ±13,9

Densité cellulaire des cultures EC P19



B)

Capacité d'élaboration de prolongement des cellules EC P19		
	sans prolongement (%)	avec prolongement (%)
Ctl	9,3	90,7
MAP2b	24	76,0
MAP2c	12	88,0
Prob	22,7	77,3
Proc	63,3	36,7
Mt	75,3	24,7



4.2.2. Cellules induites fixées à deux jours de différenciation :

Nous avons induit, à l'aide d'acide rétinoïque, la différenciation en cellules neuronales des cellules EC P19 transfectées. Nous avons fixé les neurones ainsi obtenus après deux jours et cinq jours de différenciation, pour vérifier l'influence de l'expression des constructions de MAP2 sur les différents stades de développement des neurones.

Au bout de deux jours de différenciation, les neurones issus des cellules EC P19 étaient au stade de développement des neurites mineures. L'expression des diverses constructions de MAP2 pouvait donc influencer le développement de ces neurites. Nous avons marqué par immunofluorescence les cellules obtenues à l'aide de l'anticorps contre l' α -tubuline. Nous avons également visualisé les microfilaments d'actine à l'aide de la rhodamine-phalloïdine. L'anticorps contre l'épitope 6xHis, destiné à discerner les protéines MAP2 exogènes des protéines MAP2 endogènes, n'a pas pu être utilisé car il ne permettait pas d'obtenir un marquage spécifique.

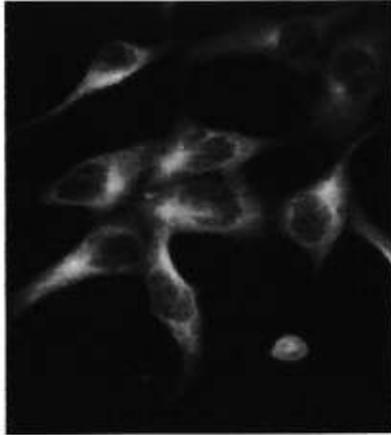
Des changements morphologiques majeurs ont pu être observés chez les cellules exprimant les constructions Proc et Mt. Les neurones issus de ces cellules ne présentaient pour la plupart aucun prolongement neuritique. Ils avaient généralement l'apparence de cellules parfaitement rondes ou légèrement ovoïdes présentant un début de prolongement neuritique (cf. Figure 15). Le pourcentage de cellules munies de prolongements a diminué drastiquement dans ces deux lignées, passant de 90,7 % à 36,7 % pour les cellules exprimant la protéine Proc et à 24,7 % pour les cellules exprimant la protéine Mt (cf. Figures 14B). La construction Proc devait normalement bloquer l'action de la protéine MAP2c endogène. Il semblerait donc qu'une protéine MAP2c fonctionnelle serait nécessaire pour initier la formation des neurites. La construction Mt,

Figure 15: Micrographies illustrant la différenciation neuronale des cellules EC P19 transfectées avec les diverses constructions de MAP2. Les cellules ont été fixées avant leur induction neuronale à l'acide rétinoïque et deux jours après leur induction. Après deux jours en culture, les neurones sont au stade de développement des neurites mineures. Les cellules exprimant Proc et Mt sont restées rondes et n'ont pas élaboré de neurites, ce qui impliquerait MAP2c dans la formation des neurites à ce stade du développement. Les cellules sont marquées en immunofluorescence avec un anticorps contre l' α -tubuline.

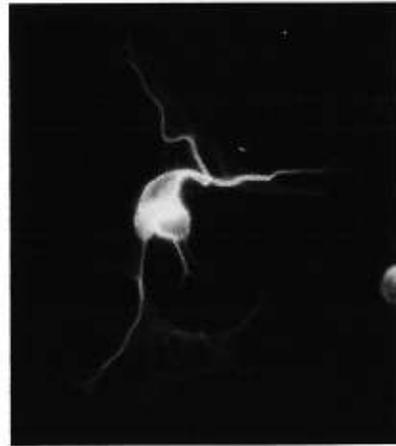
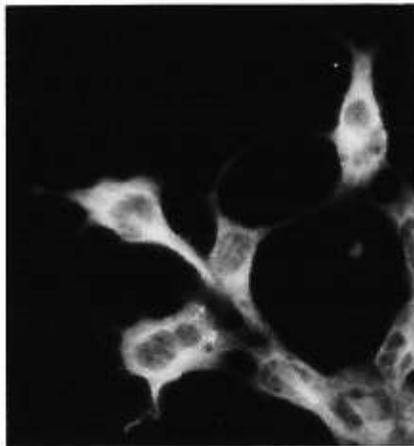
Non-induites

Induites, 2jrs

MAP2b



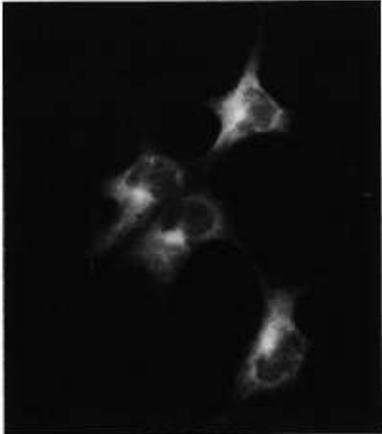
MAP2c



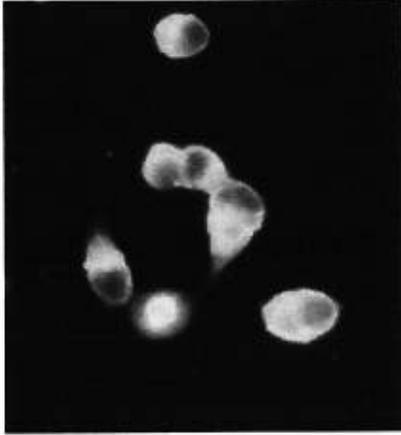
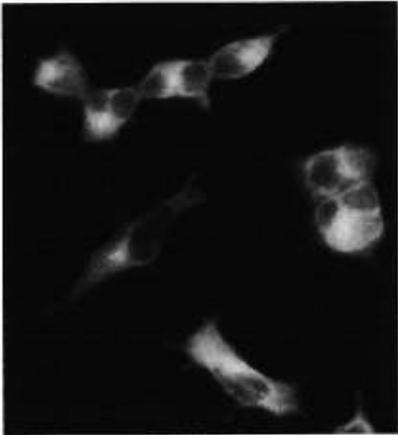
Non-induites

Induites, 2jrs

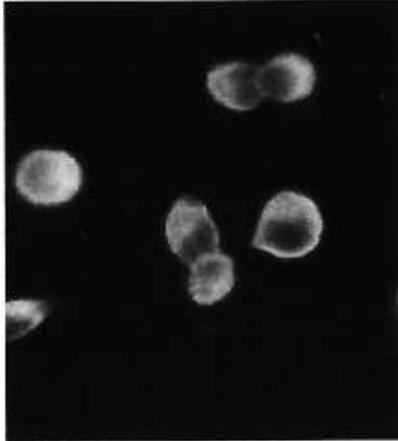
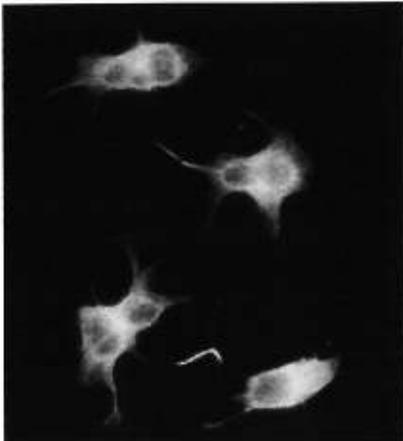
Prob



Proc



Mt



quant à elle, devait bloquer l'action des deux isoformes MAP2b et MAP2c endogènes. Aucun changement morphologique n'a été remarqué chez les neurones issus des cellules exprimant la protéine Prob. Il semble donc que l'isoforme MAP2b ne serait pas impliquée dans le processus d'initiation de la formation des neurites. Les changements morphologiques observés chez les cellules exprimant la protéine Mt seraient vraisemblablement dus au blocage de l'action de la protéine MAP2c endogène à ce stade de différenciation.

Certaines cellules exprimant les constructions Proc et Mt ont semblé en plein processus de division cellulaire lorsqu'elles ont été visualisées avec un marquage contre l' α -tubuline. Les cellules neuronales sont des cellules post-mitotiques. Pour exclure la possibilité que MAP2 soit impliquée dans le contrôle du cycle cellulaire, nous avons vérifié la densité cellulaire des cultures. Nous avons dénombré les cellules marquées avec l'anticorps contre l' α -tubuline, mais nous n'avons pas observé de changement significatif dans la densité cellulaire des pétris (cf. Figure 14A). Nous n'avons probablement pasensemencé les pétris de manière uniforme et cette variabilité a peut-être masqué une augmentation de la densité cellulaire. La vérification de la quantité des neurones dans les cultures n'a pas non plus montré d'augmentation statistiquement significative. Nous avons par contre remarqué que l'ajout de cytosine arabinoside au milieu de culture des cellules exprimant Proc et Mt induisait la mort de la grande majorité de la population. La cytosine arabinoside est un dérivé nucléotidique destiné à provoquer la mort des cellules en division. Son utilisation permet d'enrichir les cultures en neurones en éliminant les cellules non-neuronales en division. La mort cellulaire importante dans les cultures exprimant Proc et Mt semblerait indiquer qu'un isoforme

MAP2c fonctionnel serait nécessaire à la sortie du cycle cellulaire des neurones issus des cellules EC P19.

4.2.3. Cellules induites fixées à cinq jours de différenciation :

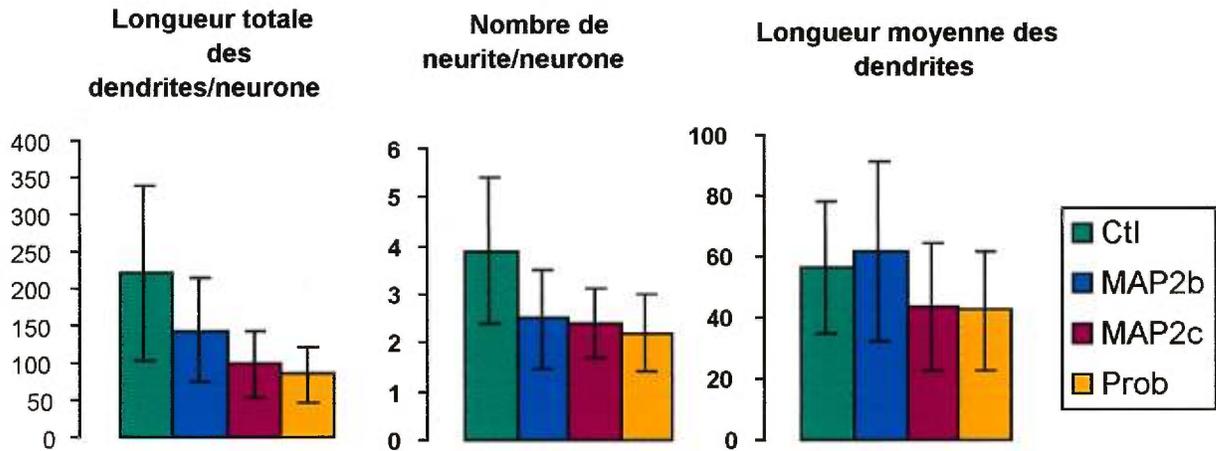
Après cinq jours de différenciation, l'arbre dendritique des neurones issus des cellules EC P19 transfectées était bien développé et les neurones commençaient à ressembler à des neurones matures. Alors que MAP2c semblait avoir un rôle dans l'initiation de la formation des neurites, nous avons cherché à savoir si MAP2b pouvait avoir un rôle dans le développement plus tardif du neurone, en termes de consolidation des dendrites ou de transformation en dendrites des neurites mineures initiées par MAP2c.

Pour explorer cette hypothèse, nous avons mesuré la longueur et le nombre des dendrites des neurones issus des cellules EC P19 transfectées. Les neurones ont donc été fixés après cinq jours de différenciation et marqués avec l'anticorps HM2 contre MAP2 pour visualiser l'arbre dendritique. La présence de l'anticorps a été révélée en utilisant un marquage au DAB qui provoque la formation d'un précipité brun. Nous avons pu ainsi analyser, à l'aide d'un système informatisé d'analyse d'image, la longueur des dendrites des neurones issus des cellules exprimant les constructions MAP2b, MAP2c et Prob (cf. Figure 16). Il s'est avéré impossible d'examiner les cellules exprimant les constructions Proc et Mt après cinq jours de différenciation car celles-ci n'ont pas survécu à l'ajout de cytosine arabinoside dans leur milieu de culture après deux jours de différenciation. Nous n'avons remarqué aucun changement significatif dans la longueur des dendrites des neurones issus des cellules P19-MAP2b, P19-MAP2c ou P19-Prob. De même, le nombre de dendrites par cellules n'est pas apparu significativement modifié

Figure 16 : Analyse des dendrites des neurones issus des cellules EC P19 après cinq jours de différenciation. Tableau et histogramme illustrant la quantification du réseau dendritique des cellules EC P19 exprimant les constructions de MAP2. Les cellules ont été fixées après cinq jours de différenciation et marquées avec l'anticorps HM2 contre MAP2 (n=75). Aucune donnée n'a pu être fournie pour les cellules exprimant les constructions Proc et Mt, car l'ajout de cytosine arabinoside dans le milieu de culture induisait une mort cellulaire trop importante lors de la différenciation des cellules exprimant ces constructions.

Mesure des dendrites à 5 jours de différenciation

	longueur totale	nb neurites	long. moy. neurite
Ctl	221,1 ±119,1	3,9 ±1,5	56,6 ±21,7
MAP2b	114,5 ±68,8	2,5 ±1,0	61,7 ±29,2
MAP2c	98,5 ±45,0	2,4 ±0,7	43,3 ±20,7
Prob	84,6 ±38,6	2,2 ±0,8	42,2 ±19,4



(cf. Figure 16). Il est toutefois possible que la grande variabilité dans les mesures ait masqué un effet de l'expression de la protéine Prob.

DISCUSSION ET CONCLUSIONS

Considérations méthodologiques :

Lors des co-infections dans les cellules Sf9, nous avons obtenu beaucoup de variabilité dans les résultats. Cette variabilité a diminué la fiabilité et a pu contribuer à masquer des changements phénotypiques. Les ratios de MOI utilisés lors des co-infections n'ont pas non plus donné lieu à des changements phénotypiques clairs. Pour observer l'effet dominant négatif d'une protéine, il faut surexprimer cette protéine par rapport à la protéine endogène. Or, lors des co-infections, nous avons surexprimé les deux protéines dans les cellules Sf9. Nous avons donc diminué la quantité relative de la protéine tronquée par rapport à la protéine cible. La différence d'expression serait beaucoup plus grande entre une protéine étrangère surexprimée et une protéine endogène à son niveau d'expression naturel. L'utilisation de ratios plus importants entre les virus permettrait de clarifier les modifications phénotypiques obtenues par suite des co-infections.

Le transfert des constructions de MAP2 dans les cellules EC P19 a permis d'impliquer spécifiquement MAP2c dans la neuritogénèse, car la construction Proc a modifié le phénotype cellulaire des cellules. Cependant, la validité des résultats obtenus reste discutable. La santé des cellules n'était pas très bonne, ce qui a pu influencer le phénotype cellulaire lors de la différenciation. De même, nous devons transfecter trois

séries de cellules avec chacune des constructions, mais nous n'avons pu réussir à reproduire les phénotypes observés avec la première. Il nous a été également impossible de vérifier l'expression des diverses constructions dans les cellules EC P19, car l'anticorps 6xHis a refusé de fonctionner. L'utilisation de l'épitope 6xHis dans ces constructions a permis d'isoler les protéines sur colonne d'affinité dans le cadre d'un autre projet, mais cet épitope s'est révélé inadéquat pour la visualisation des protéines par immunofluorescence ou par immunobuvardage. Notre laboratoire travaille actuellement à insérer les constructions de MAP2 dans le cadre de lecture de la protéine GFP, pour obtenir des protéines de fusion facilement visualisables. Après transfection des cellules EC P19, nous nous attendions à voir un effet des constructions Prob et Mt après cinq jours de différenciation, lors de l'établissement du réseau dendritique. Malheureusement, aucun changement significatif n'a paru perturber les neurones à ce stade. Nous n'avons toutefois vérifié que la longueur et le nombre des dendrites des neurones exprimant Prob. Nous aurions également pu déterminer si Prob induisait des changements plus subtils, tel le nombre des synapses.

Un ciblage inadéquat des protéines exprimées par les cellules EC P19 transfectées peut également avoir modifié le phénotype obtenu. Lors de la fabrication des constructions, nous avons dû éliminer les séquences non-traduites en 5' et en 3'. Or, le signal de ciblage de l'ARNm de MAP2 se trouve dans la partie 3' non-traduite. Seules les constructions MAP2b et Mt contenaient encore cette séquence.

1. Comportement dominant négatif des constructions :

Nous voulions étudier la fonction respective de MAP2b et MAP2c dans les cellules EC P19 en utilisant des mutants dominants négatifs. Il s'agit de surexprimer une protéine tronquée pour déplacer la protéine complète endogène. Cette approche permet un découplage entre les différents domaines fonctionnels d'une protéine à l'étude et donc de vérifier si les différents domaines agissent de manière indépendante ou non. Cette approche a été utilisée avec succès pour étudier des protéines du cytosquelette comme les MAPs tau et MAP1B (Brandt et al., 1995; Takei et al., 1997), ou les filaments intermédiaires (Chin et al., 1991; Pieper et al., 1995; Sun et al., 1997). Le découplage des deux domaines fonctionnels de MAP2 devait permettre de vérifier si le domaine de projection de MAP2 est nécessaire au fonctionnement du domaine de liaison aux microtubules. Ainsi, le domaine de projection pourrait lier des protéines qui influencent l'activité du domaine de liaison aux microtubules, permettant un couplage du domaine de liaison aux microtubules avec des protéines régulatrices. La surexpression de Prob ou de Proc devrait alors induire un changement morphologique dans les cellules EC P19. Le domaine de projection pourrait aussi agir indirectement sur la fonction du domaine de liaison aux microtubules en favorisant son interaction avec la membrane plasmique, par exemple, comme pour la MAP tau (Brandt et al., 1995). Si Prob et Proc régulent la fonction de Mt, la surexpression de la construction Mt devrait induire un changement de phénotype, car la protéine Mt ne disposera pas du domaine Prob ou Proc pour assurer sa régulation. Par contre, si le domaine de projection de MAP2 ne se lie en temps normal à aucune protéine, sa surexpression ne devrait pas modifier le phénotype des cellules EC

P19. Les constructions surexprimées seraient libres dans le cytoplasme de la cellule et seraient rapidement dégradées. Le domaine de projection aurait alors un rôle passif dans la fonction de MAP2, peut-être pour régler par encombrement stérique la distance entre les microtubules. De même, si le domaine de projection agit directement sur le domaine de liaison aux microtubules, par une interaction physique entre les deux domaines notamment, la surexpression des constructions Prob et Proc ne devrait pas modifier le phénotype des cellules EC P19.

Nous avons testé le comportement des protéines tronquées de MAP2 dans les cellules Sf9 pour vérifier si elles pouvaient perturber le phénotype induit par les protéines complètes. La construction Mt semblait perturber le phénotype induit par MAP2c, car elle a, entre autres, provoqué une baisse significative du pourcentage de cellules élaborant plus de deux prolongements, lequel est passé de 36,2 % à environ 4 % pour les cellules co-infectées. L'effet de la construction Mt sur MAP2b a par contre été plus faible et à peine statistiquement significatif. La construction Proc a réussi à perturber de façon significative le phénotype induit par MAP2c. Elle a induit une baisse du pourcentage de cellules élaborant des prolongements multiples. Le pourcentage de cellules élaborant deux prolongements est passé de 27,1 %, lorsque MAP2c était majoritaire, à 7,6 % lorsque Proc était majoritaire. De même, le pourcentage de cellules élaborant plus de deux prolongements est passé de 10,4 % à 0,6 %. Proc pourrait donc interférer avec la formation de plusieurs prolongements par la cellule. La construction Prob n'a semblé avoir aucun effet significatif sur le phénotype induit par MAP2b. Cette construction de MAP2 ne se comporterait donc pas comme un dominant négatif. Dans l'ensemble, nous avons tout de même considéré que les protéines tronquées se

comportaient probablement comme des dominants négatifs par rapport aux protéines complètes.

Il n'est toutefois pas garanti que si les constructions se comportaient de façon dominante négative dans les cellules Sf9, ce comportement soit identique dans les cellules EC P19. Le contexte cellulaire de même que le niveau d'expression peut influencer le comportement d'une protéine. Dans les cellules Sf9, nos constructions étaient sous le contrôle du promoteur viral de la polyhedrine. Une fois dans les cellules EC P19, nos constructions étaient sous le contrôle du promoteur cellulaire du gène de la kinase phosphoglycérate. Ces deux promoteurs n'ont pas la même activité. Le promoteur viral est plus puissant que le promoteur de la kinase phosphoglycérate.

2. MAP2c serait impliquée dans la neuritogénèse des neurones issus des cellules EC

P19 :

L'observation des neurones issus des cellules EC P19 transfectées avec les constructions de MAP2 a permis de conclure que MAP2c serait impliquée dans l'initiation de la formation des neurites. Seules les cellules transfectées avec les protéines tronquées Proc et Mt ont montré un phénotype particulier après deux jours de différenciation, au stade de neurites mineures. Ces cellules sont demeurées rondes et n'ont pas formé de prolongements neuritiques. Lorsqu'une approche antisens a été utilisée pour bloquer l'expression de MAP2 (Caceres et al., 1992; Dinsmore et Solomon, 1991), les neurones sont apparus incapables de former des neurites, tout comme les cellules EC P19 transfectées avec Proc et Mt. Un tel changement dans la capacité de

formation des neurites aurait donc été dû à l'inhibition de l'isoforme MAP2c. MAP2b ne serait donc pas impliquée dans la neuritogénèse à ce stade de différenciation, puisque les cellules transfectées avec la protéine tronquée Prob n'ont montré aucun changement visible. La construction Prob n'ayant pas réussi à perturber le phénotype de la construction MAP2b dans les cellules Sf9, il est possible que la construction Prob ne se soit pas comportée comme un dominant négatif dans les cellules EC P19. Peut-être que les cellules EC P19 n'exprimaient tout simplement pas le transgène car nous n'avons pas réussi à démontrer l'expression de Prob dans ces cellules. L'expression de MAP2b et MAP2c dans les cellules Sf9 confirme le rôle prédominant de MAP2c dans l'élaboration des neurites. MAP2c induit plus de cellules à élaborer des prolongements que MAP2b et favorise la production de multiples prolongements (Leclerc et al, 1993; 1996).

La formation de prolongements neuritiques nécessite une réorganisation concertée des microtubules et de l'actine, capacité que semble posséder l'isoforme MAP2c. En plus de réorganiser les microtubules lorsqu'exprimée dans les cellules Sf9, MAP2c est capable de réorganiser l'actine dans des cellules n'exprimant pas la protéine de liaison à l'actine ABP-280, et même d'y induire la formation de prolongements cytoplasmiques (Cunningham et al., 1997). Les deux isoformes MAP2b et MAP2c diffèrent par les 1372 acides aminés additionnels du domaine de projection de MAP2b. La différence de fonction des deux isoformes doit donc être régulée par leurs domaines de projection respectifs. On a d'abord assigné au domaine de projection de MAP2 un rôle dans la dimérisation de la protéine pour fixer l'espacement entre les microtubules dans les prolongements neuronaux, car on a pu observer la dimérisation de ce domaine

in vitro (Wille et al., 1992). Des essais in vivo de co-transfection ont montré que cette dimérisation était fort improbable (Burgin et al., 1994). Le domaine de projection de MAP2b et MAP2c semble en fait réguler l'activité d'initiation de formation de prolongements du domaine de liaison aux microtubules (Bélanger et al., en préparation). La protéine de liaison à l'actine ezrine, responsable de la liaison du cytosquelette d'actine à la membrane cellulaire, fonctionne selon un principe similaire. Son domaine N-terminal inhibe l'activité de formation de prolongement de son domaine C-terminal (Martin et al., 1995).

Les isoformes MAP2b et MAP2c sont toutes deux exprimées dans les neurones en développement. Le ratio cellulaire des deux isoformes pourrait induire la formation de prolongements lorsque MAP2c est majoritaire. La diminution de l'expression de MAP2c marque la fin du développement d'un neurone et la consolidation des prolongements neuritiques existants (Tucker , 1990). MAP2b devenu majoritaire pourrait alors consolider les neurites. Boucher et al. ont montré qu'une variation de la quantité relative des deux isoformes MAP2b et MAP2c pouvait modifier le phénotype obtenu dans les cellules Sf9 (1999). Plus la quantité relative d'isoforme MAP2c augmente, plus les cellules élaborent des prolongements. La notion d'un équilibre fonctionnel entre deux isoformes prévaut notamment pour les myoblastes, où le niveau relatif d'expression des isoformes d'actine non-musculaire β et γ modifie la morphologie cellulaire (Schevzov et al., 1992). L'expression élevée de l'isoforme β augmente l'épaisseur de la cellule et la surface cellulaire alors que l'expression élevée de l'isoforme γ entraîne des effets inverses. Cependant, cette notion d'équilibre fonctionnel entre MAP2b et MAP2c ne peut être le seul facteur qui régule la croissance neuritique.

En effet, des souris transgéniques adultes exprimant MAP2c ne présentent aucune croissance neuritique ou modification morphologique anormales dans les régions n'exprimant pas habituellement cette protéine (Marsden et al., 1996).

La différence de fonction entre MAP2b et MAP2c pourrait être médiée par une différence dans l'implication des deux isoformes dans la signalisation cellulaire ou par une différence dans leur phosphorylation. Les 1372 acides aminés supplémentaires du domaine de projection de MAP2b pourraient interagir avec une protéine de signalisation intracellulaire pour la coupler au domaine de liaison aux microtubules. La liaison de cette protéine permettrait de réguler à la baisse la capacité du domaine de liaison aux microtubules à induire des prolongements. On remarque dans cette séquence de 1372 acides aminés un site de liaison pour la calmoduline (Kindler et al., 1990). Les modifications phénotypiques obtenues lors de l'expression des constructions Proc et Mt dans les neurones issus des cellules EC P19 sembleraient indiquer qu'il y a eu découplage des domaines de projection et de liaison aux microtubules de MAP2c. Le domaine de projection pourrait interagir avec une protéine pour la coupler avec le cytosquelette. De la même façon, la MAP tau peut interagir avec la membrane plasmique par son domaine de projection (Brandt et al., 1995). Le domaine de projection pourrait interagir avec une grande variété de protéines, notamment avec des kinases, pour permettre la phosphorylation de MAP2, ou avec l'actine. On retrouve dans le domaine de projection de MAP2 un site putatif de liaison à l'actine (Sattilaro et al., 1981), lequel pourrait alors permettre à MAP2 de coupler le cytosquelette d'actine aux microtubules. Toutefois, Bélanger et al. (en préparation) ont montré que, *in vitro*, la

majorité de la liaison à l'actine de MAP2 passe par le domaine de liaison aux microtubules. Il n'est pas exclu que le domaine de projection interagisse avec l'actine de façon indirecte via une protéine de liaison à l'actine. Le rôle stabilisateur de MAP2b dans la neuritogénèse pourrait également être dû à un repliement physique du domaine de projection de MAP2b, lequel masquerait ainsi des sites fonctionnels présents dans le domaine de projection ou dans le domaine de liaison aux microtubules. Le domaine de projection de MAP2c serait trop court pour venir bloquer ces sites et MAP2c aurait alors accès à sa fonction d'initiation de la formation des neurites (Bélanger et al., en préparation).

La différence de fonction de MAP2b et MAP2c pourrait également être due à des différences dans la phosphorylation des deux protéines. L'état de phosphorylation de MAP2 module, *in vitro*, son interaction avec les microtubules et les filaments d'actine (Selden et Pollar, 1983; Yamauchi et Fujisawa, 1988; Drewens et al., 1997). Cet état de phosphorylation varie au cours du développement (Sanchez et al., 1995) et avec l'activité neuronale. Dans le bulbe olfactif, le blocage du conduit odorant provoque une diminution de la phosphorylation de MAP2b chez l'adulte (Philpot et al., 1997). MAP2 peut être phosphorylée, entre autres, par les MAPKinases, lesquelles sont activées en réponse à des hormones, des facteurs de croissance ou d'autres signaux extracellulaires (Cobb et al., 1991). Dans les cellules PC12, les MAPKinases sont activées par phosphorylation de leurs résidus sérine, thréonine et tyrosine par le second messenger ras en réponse à l'activation du récepteur pour le facteur de croissance NGF (Thomas et al., 1992; Wood et al., 1992). Quinlan et Halpain ont observé que la phosphorylation de

MAP2 par les MAPKinases est plus importante durant le développement neuronal des rats qu'à l'âge adulte (1996). Cela pourrait contribuer à détacher MAP2 des microtubules durant la réorganisation du cytosquelette qui accompagne la différenciation neuronale. On remarque dans la séquence de MAP2 des sites consensus de phosphorylation par la Cdk5. Cette kinase a été impliquée avec la MAP tau dans le guidage et la croissance axonale des neurones de la rétine (Nakayama et al., 1999). Cdk5 aurait un rôle dans le contrôle de l'intégrité du cône de croissance de l'axone. On pourrait envisager un rôle similaire pour Cdk5 avec MAP2 dans les dendrites. Toutefois, l'expression de Cdk5 a été jusqu'ici restreinte à l'axone et au noyau des neurones (Ino et Chiba, 1996).

3. Une protéine MAP2c fonctionnelle serait nécessaire à la sortie du cycle cellulaire des neurones issus des cellules EC P19 :

La différenciation neuronale d'une cellule nécessite sa sortie du cycle cellulaire puis l'élaboration de prolongements cytoplasmiques spécialisés, les neurites. Ces deux événements sont fort probablement liés, car la formation des neurites est un frein à la multiplication des cellules neuronales. Plusieurs études dans les cellules PC12 indiquent que la sortie du cycle cellulaire est corrélée avec la formation des prolongements neuronaux (Conti et al., 1997; Zimmer et al., 1998; Persengiev et al., 1999). Nos résultats tendent à montrer qu'une protéine MAP2c fonctionnelle serait nécessaire à la sortie du cycle cellulaire des neurones issus des cellules EC P19. Les neurones issus des cellules EC P19 transfectées avec Proc et Mt semblaient continuer à se diviser. L'isoforme MAP2b ne paraît pas impliquée dans cette fonction de MAP2, car

aucun changement n'a été visible avec les neurones issus des cellules EC P19 exprimant Prob. Il serait nécessaire de vérifier de façon plus approfondie la division des cellules neuronales exprimant Proc et Mt. L'incorporation de 5' bromodeoxyuridine (BrDU) dans le milieu de culture permettrait de visualiser les cellules en division. Ce nucléotide artificiel est incorporé dans l'ADN en réplication et peut être visualisé à l'aide d'un anticorps spécifique. Il faudrait également vérifier si ces cellules en division ont commencé leur différenciation. Les cellules EC P19 dont on a bloqué l'expression de MAP2 par un oligonucléotide antisens (Dinsmore et Solomon, 1991) avaient amorcé leur différenciation car elles exprimaient la protéine GAP-43 et l'isoforme neuronale de l'énolase. L'utilisation d'anticorps dirigés contre ces protéines permettrait de vérifier leur identité neuronale.

Nos résultats semblent confirmer le rôle de MAP2 dans la sortie du cycle cellulaire proposé par Dinsmore et Solomon (1991). Lorsque ces auteurs ont inhibé l'expression de MAP2 dans les cellules EC P19 avant qu'elles ne se différencient, les cellules ont continué de se diviser. Si MAP2c était nécessaire à la sortie du cycle cellulaire des neurones, cette protéine ne serait pas impliquée dans le maintien du neurone en dehors du cycle cellulaire. L'inhibition de l'expression de MAP2 dans des neurones embryonnaires qui ont déjà cessé de se diviser n'induit pas leur entrée en division (Caceres et al., 1992). Toutefois, l'implication de MAP2c dans la sortie du cycle cellulaire des neurones issus des cellules EC P19 pourrait être spécifique à ce modèle particulier de différenciation neuronale. Les cellules non-différenciées de la lignée cellulaire de neuroblastome/gliome 108CC15/NG108-15 expriment MAP2c alors qu'elles continuent à se diviser (Beaman-Hall et Vallano, 1993). Les cellules de cette

lignée, hybride entre des cellules neuronales et gliales, semblent réfuter l'implication de MAP2c dans la sortie du cycle cellulaire des neurones. Toutefois, l'isoforme de faible poids moléculaire de MAP2 exprimée dans ces cellules pourrait être plutôt MAP2d, découvert en 1994, et non MAP2c. L'isoforme MAP2d est fortement exprimée dans les cellules gliales du cerveau de rat (Richter-Landsberg et Gorath, 1999) et la composante gliale de la lignée 108CC15/NG108-15 pourrait modifier le comportement de MAP2.

Le cycle cellulaire des neurones est probablement sous le contrôle de plusieurs facteurs inhibiteurs intra- et extracellulaires qui maintiennent le neurone en phase Go, en dehors du cycle de division. Les contacts cellulaires et l'activation des récepteurs des facteurs de croissance sont des signaux extracellulaires qui favorisent la division neuronale. La dissociation du neuroectoderme en cellules individuelles tend à induire leur sortie du cycle cellulaire et leur différenciation en neurone (Temple et Davis, 1994). L'état de phosphorylation de MAP2c régule son affinité pour les microtubules (Drewens et al., 1997) et pourrait donc déterminer l'importance de sa contribution à la sortie du cycle cellulaire des neurones. Les MAPs sont phosphorylées entre autres par les MAPkinases qui font parties de plusieurs cascades de signalisation intracellulaire. Toutefois, ces cascades sont généralement activées en réponse à des signaux extracellulaires médiés par des récepteurs (Cobb et al., 1991; Seger et al., 1991; Thomas et al., 1992; Wood et al., 1992), ce qui pourrait faire de MAP2c un effecteur des voies de signalisation intracellulaire. La régulation du cycle cellulaire se fait par le biais de kinases, les Cdks, et MAP2 possède plusieurs sites consensus de phosphorylation par la Cdk2 et la Cdk5 (cf. Figure 2). Les Cdks sont elles-mêmes contrôlées par phosphorylation, notamment par les MAPKinases. La MAPKinase p44 peut promouvoir

l'expression de la cycline D1 et la MAPKinase p38 peut l'inhiber (Lavoie et al., 1996), contrôlant ainsi l'activité de la Cdk associée à la cycline D1. De même, les MAPKinases peuvent activer l'expression de l'inhibiteur p21 de Cdk2, induisant un arrêt du cycle cellulaire (Pumiglia et Decker, 1997). L'inhibition de l'activité des Cdks pourrait entraîner une baisse de la phosphorylation de MAP2, laquelle permettrait de stabiliser le cytosquelette à la sortie du cycle cellulaire des neurones. Le mutant Prob n'induisant aucun changement apparent dans le cycle de division des cellules neuronales, la fonction de contrôle du cycle cellulaire de MAP2b serait inhibée par la séquence additionnelle de 1372 acides aminés de son domaine de projection.

4. Directions futures :

Il n'est pas dit que, dans le modèle de différenciation neuronale utilisé, les cellules EC P19, la fonction des isoformes MAP2b et MAP2c soit identique à celle de ces deux isoformes dans les neurones. Les cascades de signalisation intracellulaire pourraient être fort différentes entre ces cellules de carcinome et les neurones. Le contexte cellulaire a une grande influence sur la fonction des protéines. Une expression relative élevée de l'isoforme β -non musculaire par rapport à l'isoforme γ -non musculaire de l'actine induit une morphologie différente selon le type cellulaire. Ainsi, les érythrocytes humains et les cellules L de souris présentent-ils une morphologie complètement différente (Bennett, 1985; Otey et al., 1986). Il est donc important de vérifier la fonction des isoformes MAP2b et MAP2c dans les neurones. La transfection de cultures primaires de neurones embryonnaires devrait permettre de vérifier la validité

des résultats dans un système d'étude plus proche de la réalité. On pourrait également introduire les mutants dominants négatifs de MAP2b et MAP2c dans les neurones embryonnaires par infection avec des adénovirus. Les neurones embryonnaires en culture sont des cellules très fragiles, réfractaires à l'introduction d'ADN étranger. L'utilisation d'un système d'expression inductible (Johns et al., 1999), telle l'induction par la tétracycline, permettrait de concevoir des souris transgéniques contenant un mutant conditionnel. Des cultures primaires de neurones embryonnaires de ces souris en présence de tétracycline permettraient d'exprimer les mutants uniquement lors de la neuritogénèse. Un tel système permettrait également d'étudier le rôle de MAP2b et de MAP2c chez l'adulte ou lors de la régénération neuronale.

BIBLIOGRAPHIE

- Arnold SE, Lee VM-Y, Gur RE and Trojanowski JQ (1991) Abnormal expression of two microtubule-associated protein (MAP2 and MAP5) in specific subfields of the hippocampal formation in Schizophrenia. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **88**: 10850-10854.
- Bain G, Yao M, Huettner JE, Finley MFA et Gottlieb DI (1998). Neuronlike Cells Derived in Culture from P19 Embryonal Carcinoma and Embryonic Stem Cells. Culturing Nerve Cells. Banker G and Goslin K. MIT : A Bradford Book, pp.189-211.
- Beaman-Hall CM and Vallano ML (1993) Distinct mode of microtubule-associated protein 2 expression in the neuroblastoma/glioma cell line 108CC15/NG108-15. *J. Neurobiol.* **24**: 1500-1516.
- Bélangier D, Cornibert S, Abi Farah C and Leclerc N (en préparation) The process outgrowth activity of MAP2b is regulated by its projection domain in Sf9 cells.
- Bennett V (1985) The membrane skeleton of human erythrocytes and its implications for more complex cells. *Annu. Rev. Biochem.* **54**: 273-304.
- Bernal J and Nunez J (1995) Thyroid hormones and brain development. *Eur. J. Endocrin.* **133**: 390-398.
- Bershadsky AD and Vasiliev JM (1988) Cytoskeleton. Plenum Press, New York.

- Blichenberg A, Schwanke B, Rehbein M, Garner CC, Richter D and Kindler S (1999) Identification of a *cis*-acting dendritic targeting element in MAP2 mRNAs. *J. Neurosci.* **19**: 8818-8829.
- Boucher M, Bélanger D, Beaulieu C and Leclerc N (1999) Tau-mediated process outgrowth is differentially altered by the expression of MAP2b and MAP2c in Sf9 cells. *Cell Motil. Cytoskel.* **42**: 257-273.
- Brandt R, Leger J and Lee G (1995) Interaction of tau with the neural plasma membrane mediated by tau's amino-terminal projection domain. *J. Cell Biol.* **131**: 1327-1340.
- Brugg B and Matus A (1991) Phosphorylation determines the binding of microtubule-associated protein 2 (MAP2) to microtubule in living cells. *J. Cell Biol.* **114**: 735-743.
- Burgin KE, Ludin B, Ferralli J and Matus A (1994) Bundling of microtubules in transfected cells does not involve an autonomous dimerization site on the MAP2 molecule. *Mol. Biol. Cell* **5**: 511-517.
- Caceres A, Mautino J and Kosik KS (1992) Suppression of MAP2 in cultured cerebellar macroneurons inhibits minor neurite formation. *Neuron* **9**: 607-618.
- Charriere-Bertrand C, Garner C, Tardy M and Nunez J (1991) Expression of various microtubule-associated protein 2 forms in the developing mouse brain and in cultured neurons and astrocytes. *J. Neurochem.* **56**: 385-391.
- Chin SS, Macioce P and Liem RK (1991) Effects of truncated neurofilament proteins on the endogenous intermediate filaments in transfected fibroblasts. *J. Cell Sci.* **99**: 335-350.

- Chiu F-C, Feng L, Chan S-O, Padin C and Federoff HJ (1995) Expression of neurofilament proteins during retinoic acid-induced differentiation of P19 embryonal carcinoma cells. *Mol. Brain Res.* **30**: 77-86.
- Cobb MH, Robbins DJ and Boulton TG (1991) ERKs, extracellular signal-regulated MAP-2 kinases. *Curr. Opin. Cell Biol.* **3**: 1025-1032.
- Coffey RL, Joly JC, Cain BD and Purich DL (1994) Exploring the microtubule-binding region of bovine microtubule-associated protein-2 (MAP-2): cDNA sequencing, bacterial expression, and site-directed mutagenesis. *Biochemistry* **33**: 13199-13207.
- Conti AM, Fischer SJ and Windebank AJ (1997) Inhibition of axonal growth from sensory neurons by excess nerve growth factor. *Ann. Neurol.* **42**: 838-846.
- Cordon-Cardo C (1995) Mutation of cell cycle regulators. *Am. J. Pathol.* **147**: 545-560.
- Correas I, Padilla R and Avila J (1990) The tubulin-binding sequence of brain microtubule-associated proteins, tau and MAP-2, is also involved in actin binding. *Biochem. J.* **269**: 61-64.
- Couchie D, Chabas S, Mavilia C and Nunez J (1996) New forms of HMW MAP2 are preferentially expressed in the spinal cord. *FEBS Lett.* **388**: 76-79.
- Cunningham CC, Leclerc N, Flanagan LA, Lu M and Janmey PA (1997) Microtubule-associated protein 2c reorganizes both microtubules and microfilaments into distinct cytological structures in an actin-binding protein-280-deficient melanoma cell line. *J. Cell Biol.* **136**: 845-857.

- Dinsmore JH and Solomon F (1991) Inhibition of MAP2 expression affects both morphological and cell division phenotypes of neuronal differentiation. *Cell* **64**: 817-826.
- DiTella MC, Feiguin F, Carri N, Kosik KS and Caceres A (1996) MAP-1B/tau functional redundancy during laminin-enhanced axonal growth. *J. Cell Sci.* **109**: 467-477.
- Doe CQ, Fuerstenberg S and Peng C-Y (1998) Neural stem cells: from fly to vertebrates. *J. Neurobiol.* **36**: 111-127.
- Drewens G, Edneth A, Preuss U, Mandelkow E-M and Mandelkow E (1997) MAPk, a novel family of protein kinases that phosphorylate microtubule-associated proteins and trigger microtubule disruption. *Cell* **89**: 297-308.
- Ferhat L, Bernard A, Ribas de Pouplana L, Ben-Ari Y and Khrestchatisky M (1994) Structure, regional and developmental expression of rat MAP2d, a MAP2 splice variant encoding four microtubule-binding domains. *Neurochem. Intl* **25**: 327-338.
- Ferralli J, Doll T and Matus A (1994) Sequence analysis of MAP2 function in living cells. *J. Cell Sci.* **107**: 3115-3125.
- Forleo P, Couchie D, Chabas S and Nunez J (1996) Four repeat high-mol-wt MAP2 forms in rat dorsal root ganglia. *J. Mol. Neurosci.* **7**: 193-201.
- Gai WP, Blumbergs PC and Blessing WW (1996) Microtubule-associated protein 5 is a component of Lewy bodies and Lewy neurites in the brainstem and forebrain regions affected in Parkinson's disease. *Acta Neuropathol.* **91**: 78-81.
- Garner CC and Matus A (1988) Different forms of microtubule-associated protein 2 are encoded by separate mRNA transcripts. *J. Cell Biol.* **106**: 779-783.

- Gilbert SF (1997) *Developmental Biology*. Sinauer Associates Inc., Sunderland. 253-340.
- Goode BL, Denis PE, Panda D, Radeke MJ, Miller HP, Wilson L and Feinstein SC (1997) Functional interactions between the proline-rich and repeat regions of tau enhance microtubule binding and assembly. *Mol. Biol. Cell* **8**: 353-365.
- Hall A (1998) Rho GTPases and the actin cytoskeleton. *Science* **279**: 509-514.
- Harada A, Oguchi K, Teng J and Hirokawa N (1998). Production of mice deficient in microtubule-associated protein 2 (MAP2), Amer. Soc. Cell Biol., 38th Annual Meeting. (abstract)
- Hernandez MA, Wandosell F and Avila J (1987) Localization of the phosphorylation sites for different kinases in the microtubule-associated protein MAP2. *J. Neurochem.* **48**: 84-93.
- Hirokawa N (1998) Kinesin and dynein superfamily proteins and the mechanism of organelle transport. *Science* **279**: 519-526.
- Ino H and Chiba T (1996) Intracellular localization of cyclin-dependant kinase 5 (CDK5) in mouse neuron : CDK5 is located in both nucleus and cytoplasm. *Brain Res.* **732** : 179-185.
- Johns DC, Marx R, Mains RE, O'Rourke B and Marban E (1999) Inducible genetic suppression of neuronal excitability. *J. Neurosci.* **19**: 1691-1697.
- Jones-Villeneuve E, McBurney MW, Rogers K and Kalnins V (1982) Retinoic acid induces embryonal carcinoma cells to differentiate into neurons and glial cells. *J. Cell Biol.* **94**: 253-262.

- Jonk LJC, De Jonge MEJ, Vervaart JMA, Wissink S and Kruijer W (1994) Isolation and developmental expression of retinoic-acid-induced genes. *Develop. Biol.* **161**: 604-614.
- Julien JP, Couillard-Despres S and Meier J (1998) Transgenic mice in the study of ALS: the role of neurofilaments. *Brain Pathol.* **8**: 759-769.
- Julien JP and Mushynski WE (1998) Neurofilaments in health and disease. *Prog. Nucleic Acid Res. Mol. Biol.* **61**: 1-23.
- Kindler S, Schulz B, Goedert M and Garner CC (1990) Molecular structure of microtubule-associated protein 2b and 2c from rat brain. *J. Biol. Chem.* **265**: 19679-19684.
- Kindler S, Müller R, Chung WJ and Garner CC (1996) Molecular characterization of dendritically localized transcripts encoding MAP2. *Mol. Brain Res.* **36**: 63-69.
- Knops J, Kosik KS, Lee G, Pardee JD, Cohen-Gould L and McConlogue L (1991) Overexpression of tau in a nonneuronal cell induces long cellular processes. *J. Cell Biol.* **114**: 725-733.
- Kosik KS (1992) Alzheimer's disease: a cell biological perspective. *Science* **256**: 780-783.
- Kosik KS and McConlogue L (1994) Microtubule-associated protein function: lessons from expression in *Spodoptera frugiperda* cells. *Cell Mot. Cytoskel.* **28**: 195-198.
- Langkopf A, Guilleminot J and Nunez J (1994) Two novel HMW MAP2 variants with four microtubule-binding repeats and different projection domains. *FEBS Lett.* **354**: 259-262.

- Lavoie JN, L'Allemain G, Brunet A, Muller R and Pouyssegur J (1996) Cyclin D1 expression is regulated positively by the p42/p44 MAPK and negatively by the P38/HOG MAPK pathway. *J. Biol. Chem.* **271** : 20608-20616.
- Leclerc N, Baas PW, Garner CC and Kosik KS (1996) Juvenile and mature MAP2 isoforms induce distinct patterns of process outgrowth. *Mol. Biol. Cell* **7**: 443-455.
- Leclerc N, Kosik KS, Cowan N, Pienkowski TP and Baas PW (1993) Process formation in Sf9 cells induced by the expression of a microtubule-associated protein 2C-like construct *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **90**: 6223-6227.
- Lee K-Y, Qi Z, Yu YP and Wang JH (1997) Neuronal Cdc2-like kinases: neuron specific forms of Cdk5. *Int. J. Biochem. Cell Biol.* **29**: 951-958.
- Lee VM-Y (1995) Disruption of the cytoskeleton in Alzheimer's disease. *Curr. Opin. Neurobiol.* **5**: 663-668.
- Lew J and Wang JH (1995) Neuronal cdc2-like kinase. *Trends Biochem. Sci.* **20** : 33-37.
- Ma Q, Chen Z, del Barco Barrantes I, de la Pompa JL and Anderson DJ (1998) *neurogenin1* is essential for the determination of neuronal precursors for proximal cranial sensory ganglia. *Neuron* **29**: 469-482.
- MacPherson PA and McBurney MW (1995) P19 embryonal carcinoma cells: a source of cultured neurons amenable to genetic manipulation. *Methods: Comp. Meth. Enzymol.* **7**: 238-252.
- Malosio ML, Gilardelli D, Paris S, Albertinazzi C and de Curtis I (1997) Differential expression of distinct members of Rho family GTP-binding proteins during neuronal development: identification of Rac1B, a new neural-specific member of the family. *J. Neurosci.* **17**: 6717-6728.

- Marsden KM, Doll T, Ferralli J, Botteri F and Matus A (1996) Transgenic expression of embryonic MAP2 in adult mouse brain: implications for neuronal polarization. *J. Neurosci.* **16**: 3265-3273.
- Martin M, Andréoli C, Sahuquet A, Montcourrier P, Algrain M and Mangeat P (1995) Ezrin NH2-terminal domain inhibits the cell extension activity of the COOH-terminal domain. *J. Cell Biol.* **128**: 1081-1093.
- Matsubara M, Kusubata M, Ishiguro K, Uchida T, Titani K and Taniguchi H (1996) Phosphorylation of Synapsin I by Map kinase and Cdk5. *J. Biol. Chem.* **271** : 21108-21113.
- Matus A (1994) Stiff microtubules and neuronal morphology. *TINS* **17**: 19-22.
- McBurney MW, Fournier S, Jardine K and Sutherland L (1994) Intragenic regions of the murine *Pgk-1* locus enhance integration of transfected DNAs into genomes of embryonal carcinoma cells. *Somat. Cell Mol. Gen.* **20**: 515-528.
- Mitchison T and Kirshner M (1988) Cytoskeletal dynamics and nerve growth. *Neuron* **1**: 761-777.
- Nagy ZS, Esiri MM and Smith AD (1998) The cell division cycle and the pathophysiology of Alzheimer's disease. *Neuroscience* **87**: 731-739.
- Nakayama T, Goshima Y, Misu Y and Kato T (1999) Role of cdk5 and tau phosphorylation in heterotrimeric G protein-mediated retinal growth cone collapse. *J. Neurobiol.* **41** : 326-339.
- Olmsted JB (1991) Non-motor microtubule-associated proteins. *Curr. Opin. Cell Biol.* **3**: 52-58.

- Otey CA, Kalnoski MH, Lessard JL and Bulinski JC (1986) Immunolocalization of the Gamma isoform of nonmuscle actin in cultured cells. *J. Cell Biol.* **102**: 1726-1737.
- Papandrikopoulou A, Doll T, Tucker RP, Garner CC and Matus A (1989) Embryonic MAP2 lacks the cross-linking sidearm sequences and dendritic targeting signal of adult MAP2. *Nature* **340**: 650-652.
- Patrick GN, Zukerberg L, Nikolic M, de la Monte S, Dikkes P and Tsai LH (1999) Conversion of p35 to p25 deregulates Cdk5 activity and promotes neurodegeneration. *Nature* **402**: 615-622.
- Persengiev SP, Kondova II and Kilpatrick DL (1999) E2F4 actively promotes the initiation and maintenance of nerve growth factor-induced cell differentiation. *Mol. Cell Biol.* **19**: 6048-6056.
- Philpot BD, Lim J, Halpain S and Brunjes P (1997) Experience-dependent modifications in MAP2 phosphorylation in rat olfactory bulb. *J. Neurosci.* **17**: 9596-9604.
- Pieper FR, Raats JM, Schaart G, Dunia I, van der Kemp A, Benedetti EL, Ramaekers FC and Bloemendal H (1995) Disruption of vimentin intermediate filaments in transgenic mice by expression of a dominant negative mutant desmin subunit. *Eur. J. Cell Biol.* **68**: 355-368.
- Pumiglia KM and Decker SJ (1997) Cell cycle arrest by the MEK/mitogen-activated protein kinase pathway. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **94**:448-452.
- Quinlan EM and Halpain S (1996) emergence of activity-dependant, bidirectional control of microtubule-associated protein MAP2 phosphorylation during postnatal development. *J. Neurosci.* **16** : 7627-7637.

- Richter-Landsberg C and Gorath M (1999) Developmental regulation of alternatively spliced isoforms of MAP2 and tau in rat brain oligodendrocytes during culture maturation. *J. Neurosci. Res.* **56**: 259-270.
- Sanchez C, Diaz-Nido J and Avila J (1995) Variations in in vivo phosphorylation at the proline-rich domain of the microtubule-associated protein 2 (MAP2) during brain development. *Biochem. J.* **306**: 481-487.
- Sattilaro R, Dentler WL and LeCluyse EL (1981) Microtubule-associated proteins (MAPs) and the organization of actin filaments in vitro. *J. Cell Biol.* **90**: 467-473.
- Schevzov G, Lloyd C and Gunning P (1992) High level expression of transfected b- and g-actin genes differentially impacts on myoblast cytoarchitecture. *J. Cell Biol.* **117**: 775-786.
- Seeger R, Ahn NG, Boulton TG, Yancopoulos GD, Panayotatos N, Radziejewska E, Ericsson L, Bratlien RL, Cobb MH and Krebs EG (1991) Microtubule-associated protein 2 kinases, ERK1 and ERK2, undergo autophosphorylation on both tyrosine and threonine residues: implications for their mechanism of activation. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **88**: 6142-6146.
- Selden SC and Pollard TD (1983) Phosphorylation of microtubule-associated proteins regulates their interaction with actin filaments. *J. Biol. Chem.* **258**: 7064-7071.
- Sharp DJ, Kuriyama R and Baas PW (1996) Expression of a kinesin-related motor protein induces Sf9 cells to form dendrite-like processes with nonuniform microtubule polarity orientation. *J. Neurosci.* **16**: 4370-4375.

- Sharp DJ, Kuriyama R, Essner R and Baas PW (1997) Expression of a minus-end-directed motor protein induces Sf9 cells to form axon-like processes with uniform microtubule polarity orientation. *J. Cell Sci.* **110**: 2373-2380.
- Schmidt-Kastner PK, Jardine K, Cormier M and McBurney MW (1996) Genes transfected into embryonal carcinoma stem cells are both lost and inactivated at high frequency. *Somat. Cell Mol. Gen.* **22**: 383-392.
- Sun D, Macioce P, Chin SS and Liem RK (1997) Assembly properties of amino- and carboxy-terminally truncated neurofilament NF-H proteins with NF-L and NF-M in the presence and absence of vimentin. *J. Neurochem.* **68**: 917-926.
- 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.
- Tanaka E and Sabry J (1995) Making the connection: Cytoskeletal rearrangements during growth cone guidance. *Cell* **83**: 171-176.
- Tanaka Y, Kawahata K, Nakata T and Hirokawa N (1992) Chronological expression of microtubule-associated proteins (MAPs) in EC cell P19 after neuronal induction by retinoic acid. *Brain Res.* **596**: 269-278.
- Temple S and Davis AA (1994) Isolated rat cortical progenitor cells are maintained in division in vitro by membrane-associated factors. *Development* **120**: 999-1008.
- Temple S and Qian X (1995) bFGF, neurotrophins, and the control of cortical neurogenesis. *Neuron* **15**: 249-252.

- Thomas SM, DeMarco M, D'Arcangelo G, Halegoua S and Brugge JS (1992) Ras is essential for nerve growth factor- and phorbol ester-induced tyrosine phosphorylation of MAP kinases. *Cell* **68**: 1031-1040.
- Threadgill R, Bobb K and Ghosh A (1997) Regulation of dendritic growth and remodeling by Rho, Rac, and Cdc42. *Neuron* **19**: 625-634.
- Tokuraku K, Katsuki M, Matui T, Kuroya T and Kotani S (1999) Microtubule-binding property of microtubule-associated protein 2 differs from that of microtubule-associated protein 4 and tau. *Eur. J. Biochem.* **264**: 96-1001.
- Tucker RP (1990) The roles of microtubule-associated proteins in brain morphogenesis: a review. *Brain Res. Rev.* **15**: 101-120.
- Tucker RP, Binder LI, Viereck C, Hemmings BA and Matus A (1988) The sequential appearance of low- and high-molecular-weight forms of MAP2 in the developing cerebellum. *J. Neurosci.* **8**: 4503-4512.
- Viereck C, Tucker R and Matus A (1989) The adult rat olfactory system expresses microtubule-associated proteins found in the developing brain. *J. Neurosci.* **9**: 3547-3557.
- Voet D and Voet JG (1990) Biochemistry. John Wiley & Sons, New York.
- Wille H, Mandelkow E-M, Dingus J, Vallee RB, Binder LI and Mandelkow E (1992) Domain structure and antiparallel dimers of microtubule-associated protein 2 (MAP2). *J. Struct. Biol.* **108**: 49-61.
- Wood KW, Sarnecki C, Roberts TM and Blenis J (1992) Ras mediates nerve growth factor receptor modulation of three signal-transducing protein kinases: MAP kinase, Raf-1, and RSK. *Cell* **68**: 1041-1050.

- Xiang C, Wang H, Shiel P, Berger P and Guerra DJ (1994) A modified alkaline lysis miniprep protocol using a single microcentrifuge tube. *BioTechniques* **17**: 30-32.
- Yamauchi T and Fujisawa H (1988) Regulation of the interaction of actin filaments with microtubule-associated protein 2 by calmodulin-dependent protein kinase II. *Biochim. Biophys. Acta* **968**: 77-85.
- Yang Y, Dowling J, Yu Q-C, Kouklis P, Cleveland DW and Fuchs E (1996) An essential cytoskeletal linker protein connecting actin microfilaments to intermediate filaments. *Cell* **86**: 655-665.
- Yang Y, Bauer C, Strasser G, Wollman R, Julien J-P and Fuchs E (1999) Integrators of the cytoskeleton that stabilize microtubules. *Cell* **98**: 229-238.
- Zimmer DB, Cornwall EH, Reynolds PD and Donald CM (1998) S100A1 regulates neurite organization, tubulin levels, and proliferation in PC12 cells. *J. Biol. Chem.* **273**: 4705-4711.