

2011.2820.8

Université de Montréal

Fonction régulatrice du domaine de projection de MAP2b sur la formation
de prolongements cytoplasmiques dans les cellules Sf9

Par

Dave Bélanger

Département de physiologie

Faculté de médecine

Mémoire présenté à la Faculté des études supérieures
en vue de l'obtention du grade de

Maître es sciences (M.Sc)

en sciences neurologiques

Février 2000

© Dave Bélanger, 2000



W
4
N58
2000
N. 125

Identification du jury

Université de Montréal
Faculté des études supérieures

Ce mémoire intitulé:

Fonction régulatrice du domaine de projection de MAP2b sur la formation
de prolongements cytoplasmiques dans les cellules Sf9

présenté par

Dave Bélanger

a été évalué par un jury composé des personnes suivantes:

Dr. Guy Doucet
Dr. Nicole Leclerc
Dr. Lisa Mckerracher

Mémoire accepté le 2-5-2000

Sommaire

Lors de leur différenciation, les neurones développent deux types de prolongements cytoplasmiques, dendrites et axones. L'élaboration de ces prolongements est médiée par les éléments du cytosquelette, plus particulièrement, les microtubules et les microfilaments d'actine (actine-F). L'expression de la protéine associée aux microtubules-2 (MAP-2) est nécessaire au développement des neurites mineures, les premiers prolongements cytoplasmiques émis par un neurone. Ceux-ci n'ont pas une identité dendritique ou axonale. Par la suite, l'expression de MAP2 est nécessaire au développement et au maintien des dendrites.

L'expression de MAP2 est régulée par épissage alternatif au cours de la différenciation neuronale. Il existe quatre isoformes de la protéine MAP2, MAP2a, MAP2b, MAP2c et MAP2d. MAP2b et MAP2c sont les isoformes les mieux caractérisées. Elles peuvent être subdivisées en deux domaines: un domaine de liaison aux microtubules situé en C-terminal et un domaine de projection en N-terminal. Le domaine de liaison aux microtubules est responsable de l'interaction de MAP2 avec les microtubules alors que le rôle du domaine de projection n'est toujours pas clairement défini. MAP2c est exprimée dans les neurones immatures alors que MAP2b est présente dans les neurones immatures et matures. Dans les neurones immatures, ces deux isoformes se retrouvent dans les neurites mineures et elles sont ciblées préférentiellement dans les dendrites au cours de la différenciation neuronale.

Le rôle respectif de MAP2b et MAP2c dans l'élaboration de prolongements cytoplasmiques par un neurone demeure inconnu. MAP2b et MAP2c diffèrent par la présence d'une séquence additionnelle de 1372 acides aminés dans le domaine de projection de MAP2b. L'insertion d'une séquence aussi importante dans le domaine de projection de MAP2b indique que ce domaine joue un rôle important. Le but de la présente étude consiste à mieux comprendre le rôle de cette séquence dans la formation de prolongements cytoplasmiques. Pour cette analyse fonctionnelle, nous avons produit six formes tronquées de MAP2b qui contiennent des délétions dans le domaine de

projection de MAP2b. Ces formes tronquées de MAP2b ont été exprimées dans les cellules ovariennes *Spodoptera frugiperda* (Sf9). En effet, ce système cellulaire est très intéressant puisque nous avons démontré que l'expression de MAP2b et MAP2c dans ces cellules résulte en la formation de prolongements cytoplasmiques. Cependant, ces deux isoformes de MAP2 induisent des patterns distincts de formation de prolongements cytoplasmiques. 60% des cellules qui expriment MAP2c développent des prolongements alors que 14% des cellules qui expriment MAP2b ont des prolongements. De plus, les cellules qui expriment MAP2c ont la tendance à développer des prolongements multiples alors que celles qui expriment MAP2b présentent un seul prolongement.

Nos présents résultats démontrent que le domaine de projection de MAP2b a un effet inhibiteur sur la capacité du domaine de liaison aux microtubules à induire la formation de prolongements cytoplasmiques. En effet, 53% des cellules qui n'expriment que le domaine de liaison aux microtubules ont des prolongements en comparaison à 14% des cellules qui expriment MAP2b. De plus, l'expression de trois formes tronquées de MAP2b qui ont une délétion partielle de la séquence additionnelle de 1372 acides aminés induit un plus grand pourcentage de cellules avec prolongements (27%, 31% et 41%). Toutefois, la séquence commune à MAP2c et MAP2b qui est située à l'extrémité 5' du domaine de projection semble favoriser la formation de plusieurs prolongements puisque sa délétion résulte en un plus faible pourcentage de cellules avec des prolongements multiples. Nos résultats suggèrent donc que l'insertion de la séquence additionnelle de 1372 acides aminés dans le domaine de projection de MAP2b diminue sa capacité à induire la formation de prolongements cytoplasmiques.

Étant donné que MAP2b et MAP2c sont capables de se lier à l'actine-F et aux microtubules, nous avons examiné la distribution de ces deux éléments du cytosquelette dans les cellules Sf9 qui expriment les différentes formes tronquées de MAP2b. Toutes les formes tronquées de MAP2b induisent la formation de faisceaux de microtubules à l'exception des formes tronquées qui correspondent aux domaines de projection de MAP2c et de MAP2b. Dans les cellules qui présentent des prolongements, on note une

réorganisation de l'actine-F. Dans les cellules qui expriment la forme mutante correspondant au domaine de projection de MAP2b, l'actine-F est distribuée sous forme d'un anneau sous la membrane plasmique. De plus, le domaine de projection a une distribution similaire. Ceci suggère que le domaine de projection de MAP2b interagit avec l'actine-F. Donc la séquence additionnelle de 1372 acides aminés pourrait contenir un domaine de liaison à l'actine. En conclusion, nos résultats indiquent que MAP2b aurait une moins grande capacité que MAP2c à promouvoir la formation de neurites mais elle pourrait contribuer à leur stabilisation au cours de la différenciation neuronale par le fait qu'elle contient des domaines additionnels de liaison à l'actine.

Table des matières

Sommaire.....	II
Table des matières.....	V
Liste des figures.....	VII
Liste des sigles et abréviations.....	IX
Remerciements.....	X
Chapitre premier.....	1
Introduction générale.....	2
Les trois types de filaments du cytosquelette.....	3
<i>Microtubules</i>	3
<i>Filaments intermédiaires</i>	4
<i>Microfilaments</i>	4
Protéines de liaison au cytosquelette.....	5
<i>Protéines de liaison aux microtubules (MAPs)</i>	5
<i>Domaines des MAPs</i>	6
<i>Protéines de liaison à l'actine (ABPs)</i>	8
<i>Protéines liant les trois éléments du cytosquelette</i>	9
Le cytosquelette des neurones.....	9
MAP2.....	10
<i>Structure primaire de MAP2</i>	10
<i>Isoformes de MAP2</i>	12
<i>Différences fonctionnelles entre les isoformes de MAP2</i>	13
<i>La fonction des isoformes de MAP2 est régulée par leurs états de phosphorylation</i>	15
MAP2 et la différenciation neuronale.....	16
Rôle du cytosquelette dans la croissance des prolongements dendritiques et axonaux par un neurone.....	16
MAP2 et le remodelage des dendrites.....	20

L'expression de MAP2 induit la formation de prolongements cytoplasmiques dans les cellules non neuronales.....	20
<i>Le système baculoviral</i>	20
<i>Expression de MAP2 dans les cellules Sf9</i>	21
Maladies reliées aux cytosquelette des neurones.....	21
Objectifs du travail.....	22
 Chapitre deuxième.....	 24
The process outgrowth activity of MAP2b is regulated by its projection domain in Sf9 cells.....	25
 Chapitre troisième.....	 62
Discussion générale et conclusions.....	63
Fonctions du domaine de projection de MAP2c.....	64
<i>Interaction avec l'actine-F</i>	64
<i>Implication dans les voies de signalisation</i>	67
Fonctions de la séquence de 1372 acides aminés du domaine de projection de MAP2b.....	68
<i>Interaction avec l'actine-F</i>	68
<i>Interaction dans les voies de signalisation</i>	69
Conformation structurale des formes opérationnelles et non-opérationnelles de MAP2b.....	70
Rôles distincts de MAP2b et MAP2c dans la différenciation neuronale...	75
Conclusion et perspectives d'avenir.....	76
 Bibliographie.....	 79
 Annexe.....	 90

Liste des figures

Chapitre premier

Figure 1 : Domaines de la protéine MAP2.....	14
Figure 2 : Stades de la différenciation neuronale.....	17
Figure 3 : Implication des différents éléments du cytosquelette dans la formation de neurites.....	19

Chapitre deuxième

Figure 1: Illustration of the different mutated forms of MAP2 constructs expressed in Sf9 cell.....	49
Figure 2: Immunoblot of baculovirally expressed truncated forms of MAP2.....	51
Figure 3: Immunofluorescence micrographs illustrating the different patterns of process outgrowth induced by the expression of the truncated forms of MAP2 in Sf9 cells.....	53
Figure 4: Histogram illustrating the number of processes per cell induced by the expression of the truncated forms of MAP2.....	55
Figure 5: Histogram illustrating the mean of the process length per cell induced by the expression of the mutated forms of MAP2b.....	57

Figure 6: Immunofluorescence micrographs illustrating the distribution of microtubules and F-actin in cells expressing the truncated forms of MAP2	59
--	----

Chapitre troisième

Figure III-1 : Schéma illustrant la structure tertiaire que pourrait adopter MAP2b, MAP2c et les formes mutantes de MAP2b.....	73
--	----

Annexe

Figure A-1 : Stratégie de clonage de MAP2b dans le cadre de lecture du vecteur pBac PAK His2.....	A-1
Figure A-2 : Stratégie de clonage pour la forme mutante MAP2b-1.....	A-5
Figure A-3 : Stratégie de clonage pour la forme mutante MAP2b-2.....	A-7
Figure A-4 : Stratégie de clonage pour la forme mutante MAP2b-3.....	A-9
Figure A-5 : Stratégie de clonage pour la forme mutante Mt	A-11
Figure A-6 : Stratégie de clonage pour la forme mutante Prob.....	A-13
Figure A-7 : Stratégie de clonage pour MAP2c dans le cadre de lecture de pBac PAK His 2 et de la forme mutante Proc.....	A-14

Liste des sigles et abréviations

ABP.....	Actin-binding protein
ADP.....	Adénosine diphosphate
ALS.....	Sclérose amyotrophique latérale
ARNm.....	Acide ribonucléique messenger
ATP.....	Adénosine triphosphate
BPAG1.....	Bullous pemphigoid antigen 1
CAM kinase.....	Ca ²⁺ /calmodulin-dependent protein kinase II
CAMP.....	Adénosine monophosphate cyclique
GDP.....	Guanosine diphosphate
GTP.....	Guanosine triphosphate
HEK.....	Human embryonic kidney cells
KHC.....	Kinesin heavy chains
MAP.....	Microtubule-associated protein
MAPK.....	Microtubule-associated protein kinase
MOI.....	Multiplicity of infection
P19.....	Cellule de Tétracarcinome
PKA.....	Protéine kinase A
Sf9.....	Spodoptera frugiperda

Remerciements

Je tiens à remercier tous ceux qui ont contribué de près ou de loin à la réalisation de ce projet de maîtrise : Sylvie Cornibert pour l'apprentissage de techniques et la fabrication de mutants, Carole Abi Fara pour la purification de protéines et Guillaume Lesage pour son soutien logistique lors de la conception des mutants.

Je tiens à remercier mon directeur de recherche Nicole Leclerc pour le guide qu'elle a été. Merci de m'avoir fait connaître ce qu'est la recherche.

Merci à Nathalie pour son soutien moral et technique, ses encouragements et sa présence. Grâce à toi, je me suis levé chaque matin pour aller mettre ma petite pierre!

Je tiens enfin à remercier mes parents, Lyne et Gaétan, pour leur confiance et leurs encouragements.

Chapitre premier

Introduction et objectif du projet

Introduction

Depuis son apparition, la vie n'a cessé de se complexifier. De simple procaryote à une organisation telle que celle du corps humain, la cellule a connu une multitude de mutations. Cette complexification de la vie est passée par la spécialisation de la cellule. Ainsi, dans un organisme plus ou moins complexe, chaque cellule occupe une fonction très précise qui est généralement gouvernée par sa morphologie. Les cellules de l'épithélium cylindrique pseudostratifié cilié de la trachée sont un bon exemple de spécialisation. Chaque cellule est pourvue de nombreux cils qui, en battant, permettent de remonter le mucus et les déchets vers les voies respiratoires supérieures (Stevens et al. 1993). Un autre exemple intéressant de spécialisation est la forme discoïde biconcave des globules rouges. Outre l'optimisation du rapport surface-volume pour l'échange d'oxygène, cette morphologie cellulaire permet aux globules de se plier, si nécessaire, dans les vaisseaux sanguins de petit calibre. La sphérocytose héréditaire est une maladie qui annule la biconcavité des globules rouges; ce qui a pour effet de les rendre mécaniquement plus fragiles. Cette pathologie est due à une anomalie de la spectrine, une protéine qui lie la membrane plasmique au cytosquelette (Zittoun et al. 1992).

La morphologie d'une cellule est déterminée par le cytosquelette. Ce dernier est composé de trois types de filaments qui diffèrent selon leur composition biochimique et leur diamètre. Ces filaments sont les microtubules, les filaments intermédiaires et les microfilaments d'actine. L'organisation structurale et moléculaire de ces filaments varie d'un type cellulaire à un autre. Nous nous intéressons, plus particulièrement, à identifier les déterminants cytosquelettiques impliqués dans l'élaboration du phénotype morphologique d'un neurone. Dans les sections suivantes, les différents éléments du cytosquelette de même que leurs rôles au cours de la différenciation neuronale seront décrits.

Les trois types de filaments du cytosquelette

Microtubules

Les microtubules sont formés de tubulines α et β ; deux sous-unités protéiques qui se polymérisent en chaînes pour constituer des protofilaments. Ces derniers sont disposés en groupes de 13 pour former un tube creux de 25 nm de diamètre. Les microtubules polymérisent et dépolymérisent constamment dans la cellule. Ce phénomène se nomme instabilité dynamique. La tubuline polymérise à partir de l'extrémité plus (+) du microtubule (l'extrémité moins (-) étant liée au centrosome). Peu de temps après son assemblage au microtubule, la molécule de guanosine triphosphate (GTP) qui est liée à la tubuline est hydrolysée en guanosine diphosphate (GDP). Toutefois, étant donné que l'hydrolyse ne se fait pas instantanément, il peut y avoir accumulation de tubuline-GTP à l'extrémité + du microtubule (coiffe GTP) si la concentration de tubuline-GTP est élevée. Dans ces circonstances, la polymérisation est favorisée puisque la tubuline-GTP ne se dissocie pas facilement du microtubule. Toutefois, lorsque la concentration de tubuline-GTP est faible, de la tubuline-GDP coiffe l'extrémité + du microtubule (coiffe GDP). La tubuline-GDP se dissocie facilement du microtubule ce qui entraîne une dépolymérisation du microtubule.

Les microtubules jouent un rôle primordial dans l'élaboration et le maintien de la morphologie cellulaire. Par exemple, si on traite des neurones avec des substances qui dépolymérisent les microtubules (ex : colchicine), ils ne produiront pas de dendrites ni d'axone (Smith 1994, Ludin et Matus 1993). Les microtubules sont également impliqués dans le transport d'organites ou de vésicules d'un compartiment cellulaire à un autre (Hall et al. 1992, Steven's et al.1993). Ils sont de plus indispensables à la mitose. En effet, ils forment les fuseaux le long desquels les chromosomes migrent lors de la division cellulaire (Steven's et al. 1993).

Filaments intermédiaires

Les filaments intermédiaires ne sont pas polaires comme les microtubules ou les microfilaments d'actine. La composition protéique des filaments intermédiaires ainsi que leurs noms varient selon le type de cellule. Dans les neurones par exemple, les filaments intermédiaires se nomment neurofilaments. Les filaments intermédiaires se retrouvent dans les endroits de la cellule qui subissent des stress mécaniques. Ancrés à des protéines transmembranaires (ex : desmosomes), ils permettent par exemple de disperser uniformément les forces de tension dans un tissu (Steven's et al. 1993, Marie Eb et al. 1993). Les filaments intermédiaires jouent également un rôle dans le maintien de la morphologie cellulaire. Par exemple, dans les neurones, ils seraient importants pour maintenir le calibre des prolongements axonaux. En effet, plus le calibre d'un axone est important, plus il contient des neurofilaments (Julien 1995; Hall et al. 1992).

Microfilaments

Les microfilaments sont composés de sous-unités nommées actine-G. Ces sous-unités sont des protéines globulaires qui polymérisent pour former des filaments nommés actine-F. Comme les microtubules, les microfilaments d'actine sont polaires. Les monomères d'actine associés à une molécule d'adénosine triphosphate (ATP) se lient à l'extrémité + du filament d'actine. Ces monomères peuvent également se lier à l'extrémité - du filament d'actine mais cette extrémité polymérise beaucoup plus lentement. Lors de la polymérisation, l'ATP est hydrolysée en adénosine diphosphate (ADP). Cette hydrolyse de l'ATP se fait toutefois plus lentement que l'hydrolyse du GTP dans les microtubules. Comme les monomères d'actine se lient surtout à l'extrémité +, le filament d'actine a tendance à s'allonger à cet extrémité. De plus comme les monomères d'actine-ATP n'ont pas tendance à se lier à l'extrémité -, il y a à cette extrémité une accumulation d'actine-ADP. L'actine-ADP se dissocie facilement du filament, ce qui entraîne une dépolymérisation à l'extrémité -. Lorsque la vitesse de polymérisation et de dépolymérisation est identique, il existe un effet de bande de roulement puisque les monomères d'actine-ATP qui se sont liés à l'extrémité + du

filament hydrolysent leur ATP et se retrouvent progressivement à l'extrémité – où ils finiront par se dissocier. Cela se produit lors de la croissance d'un prolongement cellulaire.

Les microfilaments d'actine forment un réseau dense lié et sous-jacent à la membrane plasmique. Ce réseau apporte un soutien mécanique à la membrane. (Stevens et al. 1993). Le réseau d'actine joue un rôle dans plusieurs activités cellulaires notamment dans la motilité cellulaire, l'endocytose et l'exocytose, le transport d'organelles ou de vésicules ainsi que la division cellulaire (Puius et al. 1998; Ludin et Matus 1993).

Protéines de liaison aux cytosquelette

L'organisation du cytosquelette de même que l'interaction entre les différents éléments du cytosquelette est régulée par des protéines capables de se lier à une ou à plusieurs composantes du cytosquelette.

Protéines de liaison aux microtubules (MAPs)

Les MAPs sont très conservées dans la phylogénie. Par exemple, MAP2 et Tau ont été trouvées dans des cerveaux de vertébrés non mammifères et d'amphibiens (Tucker 1990). Il existe plusieurs types de MAPs et elles ont plusieurs fonctions (revue : Tucker 1990; Maccioni et al. 1995). Deux types de MAPs, les MAPs structurales et les MAPs motrices, ont été particulièrement étudiées. Les MAPs structurales sont impliquées dans l'assemblage et l'organisation des microtubules. Quant aux MAPs motrices, elles sont impliquées dans le transport d'organelles ou de vésicules le long des microtubules (Hall et al. 1992). Dans cette section, nous discuterons seulement des MAPs structurales.

Les MAPs structurales favorisent l'assemblage des microtubules en diminuant la concentration de tubuline libre nécessaire à l'élongation du microtubule (Ferreira et al. 1989). Elles permettent également la stabilisation des microtubules (Hall et al 1992;

Ludin et Matus 1993; Leclerc et al. 1996). Ces MAPs servent aussi à faire le lien entre les microtubules, entre les microtubules et les microfilaments d'actine et entre les microtubules et les neurofilaments (Yang et al. 1999, Heimann et al. 1985, Miyata et al. 1986)

Quatre classes de MAPs ont été largement étudiées : MAP1, MAP2, MAP4 et Tau. Toutes ces MAPs sont des protéines fibreuses qui forment des projections filamenteuses à la surface des microtubules (Hirokawa 1994). MAP2, MAP4 et Tau sont des protéines thermostables qui induisent la polymérisation des microtubules de même que la formation de faisceaux de microtubules (bundling). MAP1 ne partage pas ces caractéristiques (Hirokawa 1994; Olmsted 1991).

Domaines des MAPs :

Le clonage et le séquençage de MAP2, MAP4 et Tau ont révélé que ces trois protéines possèdent un domaine de liaison aux microtubules en C-terminal. Le N-terminal a été nommé domaine de projection puisqu'on présume qu'il projette à la surface des microtubules.

Le domaine de liaison aux microtubules est généralement composé d'acides aminés basiques. Ce domaine commun à MAP2, MAP4 et Tau comprend trois ou quatre séquences répétées de 33 acides aminés (Olmsted et al. 1991). Goode et Feinstein (1994) ont même démontré que la région située entre la première et la deuxième séquence répétée de la protéine Tau adulte interagit également avec le microtubule. De plus, ils ont identifié les deux acides aminés comprises dans cette séquence (Lysine 265 et Lysine 272) qui sont nécessaires à la liaison de Tau avec un microtubule (Goode et Feinstein 1994).

Il y a toutefois certaines MAPs qui n'ont pas un domaine de liaison aux microtubules conventionnel. On a par exemple identifié dans MAP1a un domaine de liaison aux microtubules qui ne comprend pas les séquences répétées et qui est majoritairement constitué d'acides aminés acides (Cravchik et al. 1994). MAP1b est un autre cas

d'exception. En effet, cette isoforme de MAP1, possède un domaine de liaison aux microtubules en N-terminal au lieu d'en C-terminal comme pour MAP2, MAP4 et Tau. De plus, le domaine de liaison aux microtubules de MAP1b est caractérisé par 21 copies d'une séquence contenant le motif lysine-lysine-glutamate-glutamate ou lysine-lysine-glutamate (Olmsted 1991; Hirokawa 1994).

Certaines protéines motrices de liaison aux microtubules sont également dépourvues d'un domaine de liaison aux microtubules en C-terminal (Rodionov et al. 1990). La Kinésine, par exemple, possède un domaine de liaison aux microtubules en N-terminal. Ce domaine est composé de deux chaînes lourdes de 129 kDa (KHCs) qui forment un domaine globulaire (Hirokawa 1998). Le domaine de liaison aux microtubules de la Dynéine est quant à lui situé dans les parties N-terminale et centrale de la protéine. Il forme lui aussi un domaine globulaire (Hirokawa 1998). Le domaine de liaison aux microtubules des MAPs motrices est donc globulaires; contrairement à celui des MAPs structurales qui serait plutôt fibreux.

Les distinctions qui caractérisent les domaines de liaison aux microtubules des MAPs pourraient définir les interactions différentes des ces MAPs avec les microtubules. Par exemple, on peut supposer que la Kinésine, qui agit comme molécule de transport antérograde le long des microtubules, possède des propriétés de liaison aux microtubules complètement différentes de celle de MAP2 qui elle, stabilise et inter-relie les microtubules dans les dendrites (Noble et al. 1989).

Le domaine de projection des MAPs est très variable. Il tient son nom du fait qu'il projette à la surface du microtubule. Sa fonction est moins bien connue. On sait que les domaines de projection de MAP2 et Tau déterminent l'espacement entre les microtubules des dendrites et axones (Chen et al. 1992). On pense également qu'ils pourraient interagir avec d'autres éléments du cytosquelette ou cellulaires (Hernandez et al. Scott et al. 1990; Friedrich et Aszodi, 1991; Vallee, 1990). En effet, Brandt et al. (1995) ont démontré que le domaine de projection de Tau interagit avec la membrane plasmique et que cette interaction est nécessaire à la formation de neurites par les

cellules PC12. Le domaine de projection pourrait également avoir un rôle dans la voie de signalisation intracellulaire. Par exemple, des sites de liaison à des kinases (CAM kinase etc.) ont été identifiés dans ce domaine (Friedrich et Aszodi, 1991).

Protéines de liaison à l'actine (ABPs)

Dans la cellule, l'assemblage et la fonction des microfilaments d'actine sont régulés par plusieurs classes d'ABPs. (McGough 1998). Il existe quatre classes de ABPs qui jouent des rôles distincts (McGough 1998). La première classe se lie sur le coté du microfilament et induit la formation de faisceaux de microfilaments. Elle permet également l'enchevêtrement de ces faisceaux en un réseau dense nommé : gel d'actine (ex : ABP-280, α -actine et scruine). La deuxième classe régule la polymérisation des microfilaments soit en se liant à ses extrémités ou en séquestrant l'actine-G (ex : gelosine, cofiline). La troisième classe stabilise les microfilament d'actine en se liant sur le coté du microfilament (ex : tropomyosine). La dernière classe lie les microfilaments d'actine à la membrane cytoplasmique (ex : spectrine, ankyrine) (Bamburg and Bernstein, 1991). Toutes les ABPs se lient sur l'actine-F de manière similaire : les sous-domaines 1 et 2 de l'actine-F sont des « hot spots » de liaison aux ABPs (McGough 1998; Puius et al 1998). On pense que ces hot spots seraient stochiométriquement plus accessibles pour la liaison des ABPs.

La plupart des protéines de liaison à l'actine (ex : fimbrine, dystrophine, spectrine) sont caractérisées par un domaine conservé de liaison à l'actine de 27kDa. Un domaine de liaison à l'actine typique comprend environ 250 acides aminés et est composé de deux domaine CH (calponin homology) répétés en tandem (Puius et al. 1998). Les domaines de liaison à l'actine et aux microtubules ont donc certains points en commun comme par exemple la présence de séquences répétées. On a d'ailleurs rapporté pour MAP2 que son domaine de liaison à l'actine est situé dans le domaine de liaison aux microtubules (Sattilaro et al. 1981; Cunningham et al. 1997) et qu'il correspondrait à la deuxième séquence répétée de 33 acides aminés (Correas et al. 1990). Cette même séquence répétée lie également les microtubules (Ludin et al. 1996).

Protéines liant les trois éléments du cytosquelette

On a récemment mis en évidence l'existence de protéines pouvant lier plusieurs éléments du cytosquelette à la fois. La plakin, par exemple, était connue pour lier les filaments intermédiaires et les microfilaments d'actine. En 1999, Yang et al. ont montré qu'une des isoformes de la plakin pouvait également lier les microtubules. La plakin, en se dimérisant, pourrait relier les différents filaments du cytosquelette (Yang et al. 1999). La protéine MAP2 est un autre exemple intéressant. Connue au départ pour sa capacité de lier les microtubules, MAP2 a ensuite été caractérisée par sa capacité d'interagir avec les microfilaments d'actine (Cunningham et al 1997). Enfin, des études morphologiques et biochimiques suggèrent que MAP2 pourrait inter-relier les microtubules avec les filaments intermédiaires (Tucker 1990; Maccioni et al. 1995). Déjà en 1985, Heimann et al. montraient, par des expériences de co-sédimentation, que MAP2 se lie de façon directe avec la sous-unité NF70 des neurofilaments. Il a également été montré que cette interaction est modulée par la Ca^{+} -calmoduline (Miyata et al. 1986). Des protéines comme plakin et MAP2 pourraient jouer un rôle crucial dans le maintien et l'intégrité du cytosquelette ou dans la réorganisation simultanée de plusieurs éléments du cytosquelette qui précède un changement fonctionnel de la cellule. D'ailleurs, dans les neurones, une mutation de l'isoforme neuronale de la plakin (dystonine) induit une désorganisation majeure du cytosquelette qui conduit à la mort cellulaire (Dalpé et al. 1998).

Le cytosquelette des neurones

Les neurones ont une morphologie particulière qui leur permet de communiquer entre eux. Au cours de leur différenciation, les neurones émettent deux types de prolongements : les dendrites et l'axone. Les dendrites reçoivent l'influx électrique de d'autres neurones tandis que l'axone envoie l'influx électrique vers d'autres neurones. Les deux types de prolongements diffèrent selon des critères morphologiques et biochimiques. D'abord, l'axone est unique, de diamètre fin et uniforme. Les dendrites, quant à elles, peuvent être très nombreuses. Leur diamètre diminue le long de leur

trajectoire (large près du soma et mince à leur extrémité). Les dendrites sont généralement courtes et comprennent plusieurs ramifications (Kandel et al. 1991).

La composition biochimique distincte des dendrites et de l'axone repose principalement sur la distribution préférentielle des protéines du cytosquelette dans l'un ou l'autre de ces compartiments cellulaires. Par exemple, l'axone est très riche en neurofilaments alors que les dendrites en contiennent peu. Les dendrites et l'axone renferment des microtubules. Cependant, l'orientation de ces derniers est différente dans les deux compartiments. Dans l'axone, l'extrémité - des microtubules est dirigée vers le corps cellulaire et l'extrémité + vers la terminaison nerveuse. Dans les dendrites, l'orientation des microtubules est mixte puisque l'extrémité + se retrouve distale ou proximale au corps cellulaire. Malgré cette différence d'orientation des microtubules entre les dendrites et l'axone, les microtubules sont toujours organisés en faisceaux parallèles à l'axe longitudinal du prolongement (Hirokawa 1991). Les dendrites et l'axone diffèrent également en leur composition en MAPs. On retrouve par exemple MAP2b seulement dans les dendrites et le corps cellulaire tandis que la MAP Tau est retrouvée seulement au niveau de l'axone (Hall et al. 1992). Enfin, la composition en ABPs peut aussi varier en fonction du compartiment cellulaire. L'hétérodimère $\alpha\beta$ de la spectrine est retrouvé au niveau des dendrites tandis que la forme $\alpha\gamma$ de la spectrine est exprimée surtout au niveau de l'axone (Ludin et Matus 1993).

MAP2

Structure primaire de MAP2

Les protéines MAP2 sont constituées de deux domaines (Garner and Matus 1988) (figure1). Le domaine de liaison aux microtubules, ainsi nommé pour sa capacité à promouvoir l'assemblage des microtubules, est situé en C-terminal. Il a environ 330 acides aminés et comporte de trois à quatre séquences répétées imparfaites de 33 acides aminés (1-RLINQPLPLKN-VKSKIGSTDNIKIQPKGGQ; 2-VRILNKKMDFS-KVQS RCGSKDNIKHSAGGGN; 3-VQIVTKKIDLSH-VTSKCGSLKNIRHRPGGGR; 4-VK

IESVKLDFKEKAQAKVGS LDNAHHVPGGGN (Ludin et al. 1996)) qui médient la liaison aux microtubules (Lewis et al. 1988). Ludin et al. (1996) ont montré, en créant des délétions des différentes séquences répétées, que la troisième séquence répétée (correspondant à la deuxième séquence répétée de MAP2a, MAP2b et MAP2c) est capable d'induire la formation de faisceaux de microtubules et de prolongements cytoplasmiques par les cellules HeLa et PLC.

Le domaine de projection de MAP2 est situé en N-terminal et est de taille variable selon l'isoforme. Il contient deux séquences hautement conservées (650^e-940^e acide aminé; 1370^e-1650^e acide aminé) entre le rat, la souris et l'humain (Kindler et al. 1990). La deuxième séquence est intéressante puisqu'elle est riche en prolines et elle contient plusieurs séquences consensus pour les CAM kinases II et cAMP kinases. De plus, elle est située juste en 5' du domaine de liaison aux microtubules. Ces caractéristiques suggèrent que cette séquence serait une région charnière de MAP2 et que ses propriétés fonctionnelles pourraient être modifiées par la phosphorylation (Kindler et al. 1990). Une autre région charnière riche en prolines est présente au site d'épissage de MAP2b et MAP2c (Kindler et al. 1990). D'après des analyses informatiques de la séquence de MAP2, le domaine de projection serait composé d'environ 19 hélices séparées par des boucles. Ceci suggère que ce domaine serait un bâtonnet très flexible (Kindler et al. 1990).

La fonction du domaine de projection de MAP2 n'est pas très bien connue. On sait toutefois qu'il y a un site de liaison pour la sous-unité RII de la protéine kinase cAMP-dépendante (PKA), situé entre le 83^e et le 113^e acide aminé (Scott et al. 1990; Friedrich et Aszodi, 1991; Vallee, 1990). Cette kinase forme des dimères (Taylor et al. 1989). Cela pourrait donc offrir un moyen indirect de liaison entre deux protéines MAP2 (Friedrich et Aszodi, 1991). Le domaine de projection pourrait également imposer une certaine conformation à la protéine MAP2 (Kindler et al. 1990). Enfin, comme plusieurs kinases (ex : cAMP kinase, PKA) interagissent avec MAP2, on pense que le domaine de projection pourrait être impliqué dans les voies de signalisation (Goldenring et al. 1985; Silliman et Sturgill 1989; Itoh et al. 1997; Sontag et al. 1995; Morishima et al. 1996).

Isoformes de MAP2

Il existe quatre isoformes majeures de la protéine MAP2. Toutes proviennent du même gène et sont produites par épissage alternatif. Elles sont toutefois caractérisées par des différences structurales et fonctionnelles. MAP2b est une protéine de 1828 acides aminés qui migre à 280 KDa sur gel de polyacrylamide. Elle est exprimée tout au long de la vie du neurone (Kindler et al. 1990). MAP2b est trouvée seulement au niveau des dendrites et du corps cellulaire.

MAP2c est l'isoforme juvénile de MAP2. L'expression de MAP2c débute avant celle de MAP2b (Tucker 1990). C'est une protéine de 467 acides aminés qui migre à 70 KDa sur gel de polyacrylamide. Elle possède la même structure primaire que MAP2b mais est amputée d'une séquence de 1372 acides aminés dans le domaine de projection (Papandrikopoulou et al. 1989) (figure1). Elle est surtout exprimée au cours de la vie embryonnaire mais est également retrouvée chez l'adulte dans les régions du cerveau qui renferment des neurones qui ont la capacité de régénérer (ex : bulbe olfactif) (Garner and Matus, 1988). MAP2c est retrouvée dans les dendrites et le corps cellulaire mais est également présente dans les axones de certains types de neurones; comme par exemple dans les neurones du nerf optique et les fibres parallèles du cortex cérébelleux (Tucker 1990).

L'isoforme MAP2a est une variante de MAP2b. Elle est générée par épissage alternatif (Chung et al. 1996). MAP2a est une protéine de 288 KDa qui diffère de MAP2b par l'insertion de 246 nouveaux nucléotides en 5' du lieu d'épissage de l'ARNm de MAP2b et MAP2c (Chung et al. 1996) (figure1). Son expression dans le cerveau du rat se produit autour du douzième jour postnatal et est maintenue dans les neurones adultes (Kindler et al.). De plus, MAP2a est retrouvée surtout au niveau des dendrites et du corps cellulaire (Tucker, 1990). Ceci suggère que MAP2a a un rôle dans la stabilisation du cytosquelette dendritique plutôt que dans l'organisation du cytosquelette lors de la croissance dendritique (Chung et al. 1996).

L'isoforme MAP2d est une variante de MAP2c. Elle possède une séquence répétée supplémentaire entre la première et la deuxième des trois séquences répétées qui servent de lien aux microtubules (Doll et al. 1993) (figure1). MAP2d est retrouvée dans les cellules gliales mais également dans les neurones. L'expression de MAP2d débute

après celle de MAP2c. De plus, MAP2d est présente dans les neurones adultes (Ferhat et al 1996).

Des études ont récemment mis en évidence l'existence d'autres isoformes de MAP2. En 1996, Forleo et al. ont décrit la présence de quatre isoformes nouvelles de MAP2b présentes dans les ganglions des racines dorsales. Elles diffèrent de MAP2b soit par la présence de quatre séquences répétées dans le domaine de liaison aux microtubules au lieu de trois (Langkopf et al 1994), soit par l'absence de l'exon 10 ou 11 (Forleo et al 1996) ou enfin, soit par la présence de l'exon 7a, ou de l'exon 8 (Guilleminot et al. 1995) ou des deux à la fois (Forleo et al 1996).

Différences fonctionnelles entre les isoformes de MAP2

Toutes les isoformes de MAP2 induisent l'assemblage et la stabilisation des microtubules. Cependant, elles diffèrent en ce qui concerne leur capacité à organiser les microfilaments d'actine. MAP2c est capable d'inter-relier les microfilaments d'actine les uns aux autres et ainsi induire la formation d'un gel d'actine (Cunningham et al 1997). Des études proposent que le domaine de liaison à l'actine de MAP2 serait situé dans le domaine de liaison aux microtubules (Cunningham et al 1997). En 1990, Correas et al ont montré qu'un peptide qui correspond à la deuxième séquence répétée du domaine de liaison aux microtubules de MAP2 lie l'actine-F. Toutefois, pour inter-relier les microfilaments d'actine, il faut que la protéine possède deux sites de liaison à l'actine ou qu'elle en possède un seul mais qu'elle puisse former des dimères. Il y a des évidences que MAP2c peut former des dimères (Wille et al.1992). Quant à l'isoforme MAP2b, il est capable de lier les microfilaments d'actine mais il démontre moins de facilité à organiser l'actine en réseau (formation d'un gel d'actine) que l'isoforme MAP2c (Cunningham et al. 1997).

Il existe également des différences fonctionnelles entre les isoformes MAP2c et MAP2d. En 1996, Ferhat et al. ont montré que lorsque MAP2d est exprimée dans les cellules HEK 293 (cellules embryonnaires de rein humain) , elle induit la formation de microtubules qui sont organisés en faisceaux plus fins et plus longs que ceux induits par MAP2c. De plus les deux isoformes exercent un effet différent sur la stabilisation des microfilaments d'actine. Par exemple, MAP2d a un effet protecteur contre la

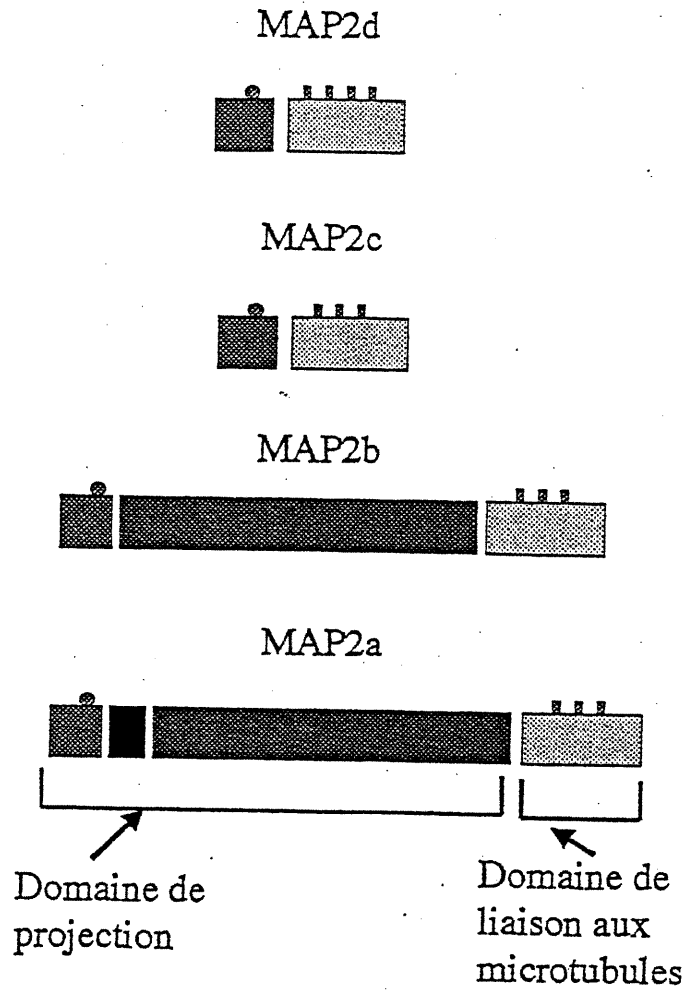


Figure 1: Isoformes et domaine de la protéine MAP2

Les isoformes MAP2b et MAP2c ont en commun le domaine de liaison aux microtubules et une partie du domaine de projection. Toutefois, MAP2b possède une séquence additionnelle et ininterrompue de 1372 acides aminés à la jonction des domaines de projection et de liaison aux microtubules de MAP2c. MAP2a a une insertion de 82 acides aminés en 5' du lieu d'épissage de MAP2b et MAP2c. MAP2d possède une quatrième séquence répétée dans le domaine de liaison aux microtubules. L'expression des isoformes est régulée par épissage alternatif.

dépolymérisation de l'actine induite par la cytochalasine D. Ce n'est pas le cas de MAP2c (Ferhat et al 1996). Ces différences fonctionnelles de même que le fait que l'expression de MAP2d soit maintenue au cours de la vie adulte (contrairement à MAP2c) suggèrent que MAP2d aurait un rôle dans la stabilisation des neurites; contrairement à MAP2c qui serait plutôt impliquée dans la croissance des neurites (Ferhat et al. 1996).

La fonction des isoformes de MAP2 est régulée par leurs états de phosphorylation

L'activité des MAP2 est également régulée par leurs différents états de phosphorylation. En effet, MAP2 peut être phosphorylée par une multitude de kinases et déphosphorylée par plusieurs phosphatases (Goldenring et al. 1985; Hoshi et al. 1992; Itoh et al 1997). La majorité de ces sites de phosphorylation ne sont pas très bien identifiés. On sait toutefois qu'il existe un site de phosphorylation pour la CAM kinase II entre le 1450e et 1500e acide aminé de MAP2b (Friedrich et Aszodi 1991). Un autre site de CAM kinase a été trouvé sur la sérine 1805 (Wille et al 1992). Il y a également, comme mentionné plus tôt, un site de liaison pour la PKA vers le 100e acide aminé (Friedrich et Aszodi 1991; Scott et al, 1990). L'analyse de la composition en acides aminés de MAP2 suggère qu'elle contient 83 sites de phosphorylation. Il y aurait 20 sites pour la PKA, 8 sites pour la CAM Kinase II, 16 sites pour la Protéine kinase C et 47 sites pour les Caseine kinases (Friedrich et Aszodi 1991).

Les effets de la phosphorylation des MAPs sur le cytosquelette sont bien perceptibles. Les différents états de phosphorylation des MAPs régulent l'affinité de ces MAPs pour les microtubules ou d'autres éléments du cytosquelette. On a rapporté par exemple que MAP2 est un substrat de la kinase II et que cette dernière induit un désassemblage des microtubules (Yamauchi et al 1988; Brugg and Matus 1991).

Il est proposé que la phosphorylation de MAP2 jouerait un rôle dans l'assemblage des microtubules puisque la phosphorylation du domaine de liaison aux microtubules de MAP2 inhibe l'habilité de MAP2 à induire la polymérisation et l'assemblage des microtubules (Brugg and Matus, 1991; Goldenring et al. 1985; Silliman et Sturgill 1989). Comme le domaine de projection comporte également des sites de phosphorylation (Silliman et Sturgill, 1989; Friedrich et Aszodi, 1989; Kindler et al,

1990), il est possible que la phosphorylation de ce domaine de MAP2 ait des conséquences similaires à la phosphorylation du domaine de liaison aux microtubules.

MAP2 et la différenciation neuronale

Lors de la différenciation neuronale, le neuroblaste émet des prolongements qui deviendront l'axone et les dendrites. La mise en culture de neurones isolés de l'hippocampe prélevés chez des embryons de rats a permis d'identifier cinq stades de différenciation morphologique neuronale (figure 2) (Dotti et al 1988). 1) Le neuroblaste développe d'abord un lamellipode tout autour de la circonférence du corps cellulaire. 2) La lamellipode se consolide pour former les neurites mineures. Ces premiers prolongements n'ont pas une identité axonale ou dendritique. 3) Après 1,5 jours en culture, une des neurites s'allonge plus rapidement que les autres et deviendra l'axone. 4) Les autres neurites mineures s'allongent seulement quelques jours plus tard. Elles deviendront les dendrites. 5) La différenciation se termine enfin par une phase de maturation des prolongements.

Des études ont montré que l'expression de MAP2 est cruciale lors de la différenciation neuronale. En 1992, Caceres et al. ont supprimé l'expression de MAP2 dans des cultures de macroneurones du cervelet en ajoutant des oligonucléotides antisens à l'ARNm de MAP2 dans le milieu de culture. La suppression de MAP2 empêche 80% des cellules à passer du stade 1 au stade 2 de la différenciation neuronale. Donc MAP2 semble agir à un stade très précoce de la différenciation neuronale.

Rôles du cytosquelette dans la croissance des prolongements dendritiques et axonaux par un neurone

L'élaboration de prolongements dendritiques et axonaux par un neurone est accompagnée d'une réorganisation majeure du cytosquelette qui implique principalement les microfilaments d'actine et les microtubules (Mitchison et Kirschner, 1988). Dans un premier temps, le neuroblaste développe un lamellipode, une structure riche en actine, tout autour du corps cellulaire. À ce stade, les microtubules se retrouvent majoritairement dans la région périnucléaire. Par la suite, l'actine s'organise

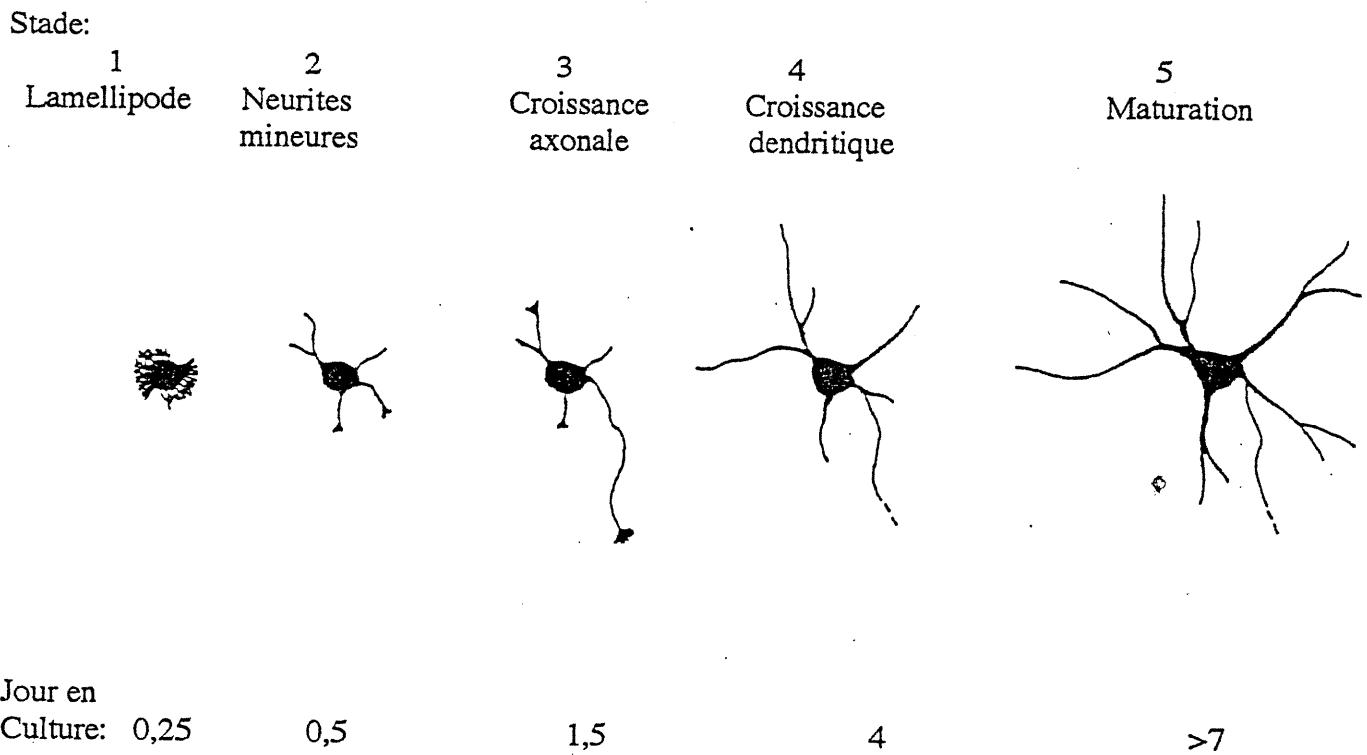


Figure 2 : Stades de la différenciation neuronale (Tiré de Dotti et al. 1988 figure 9 p.1466)

Stade 1 : le neuroblaste développe d'abord un lamellipode tout autour de la circonférence du corps cellulaire.

Stade 2 : le lamellipode se consolide pour former les neurites mineures. Ces premiers prolongements n'ont pas d'identité axonale ou dendritique.

Stade 3 : à 1,5 jours de croissance, une des neurites s'allonge rapidement pour devenir l'axone.

Stade 4 : les autres neurites mineures s'allongent seulement quelques jours plus tard. Elles deviendront les dendrites.

Stade 5 : la différenciation se termine enfin par une phase de maturation des prolongements.

en une sorte de treillis qui permet l'orientation des microtubules dans la direction que prendra le prolongement. Les microtubules sont ensuite capturés en un site commun, sous la membrane cytoplasmique, pour être stabilisés dans la direction de l'élongation. Enfin, les faisceaux de microtubules sont stabilisés (Mitchison et Kirschner 1998) (figure 3).

Les microtubules et les microfilaments d'actine interagissent pour coordonner la croissance d'une neurite. Dans les dernières années, on a tenté d'identifier les molécules impliquées dans cette interaction. Des études suggèrent que MAP2c pourrait être une de ces molécules. En effet, il a été démontré que MAP2c peut coordonner une réorganisation de l'actine-F et des microtubules qui résulte en la formation de prolongements cytoplasmiques. Pour démontrer ceci, MAP2c a été microinjectée dans une lignée cellulaire de mélanome déficiente en protéine de liaison à l'actine 280 (ABP-280). Ces cellules présentent une instabilité de la membrane plasmique qui se traduit par du "blebbing" (tremblements de la membrane cellulaire). Suite à la microinjection de MAP2c dans ces cellules, il y a arrêt du "blebbing" et formation d'un lamellipode duquel émergent des prolongements cytoplasmiques contenant des faisceaux de microtubules. Il est intéressant de noter que MAP2b peut stabiliser la membrane mais n'est pas capable d'induire la formation d'une lamellipode ni la formation de prolongements cytoplasmiques dans cette lignée cellulaire. Ces résultats suggèrent donc que MAP2c jouerait un rôle dans l'initiation de la croissance neuritique alors que MAP2b serait plutôt impliquée dans la stabilisation du cytosquelette au cours du développement d'une neurite. D'ailleurs, le pattern d'expression de MAP2c et MAP2b dans le cerveau concorde bien avec ces résultats. En effet, MAP2c est présente au cours du développement et demeure exprimée dans des régions du cerveau où les neurones conservent la capacité de se régénérer (ex. bulbe olfactif) alors que MAP2b est exprimée tout au long du développement et dans les neurones adultes. De plus, l'expression de MAP2b est nécessaire pour maintenir la morphologie des dendrites chez l'adulte.

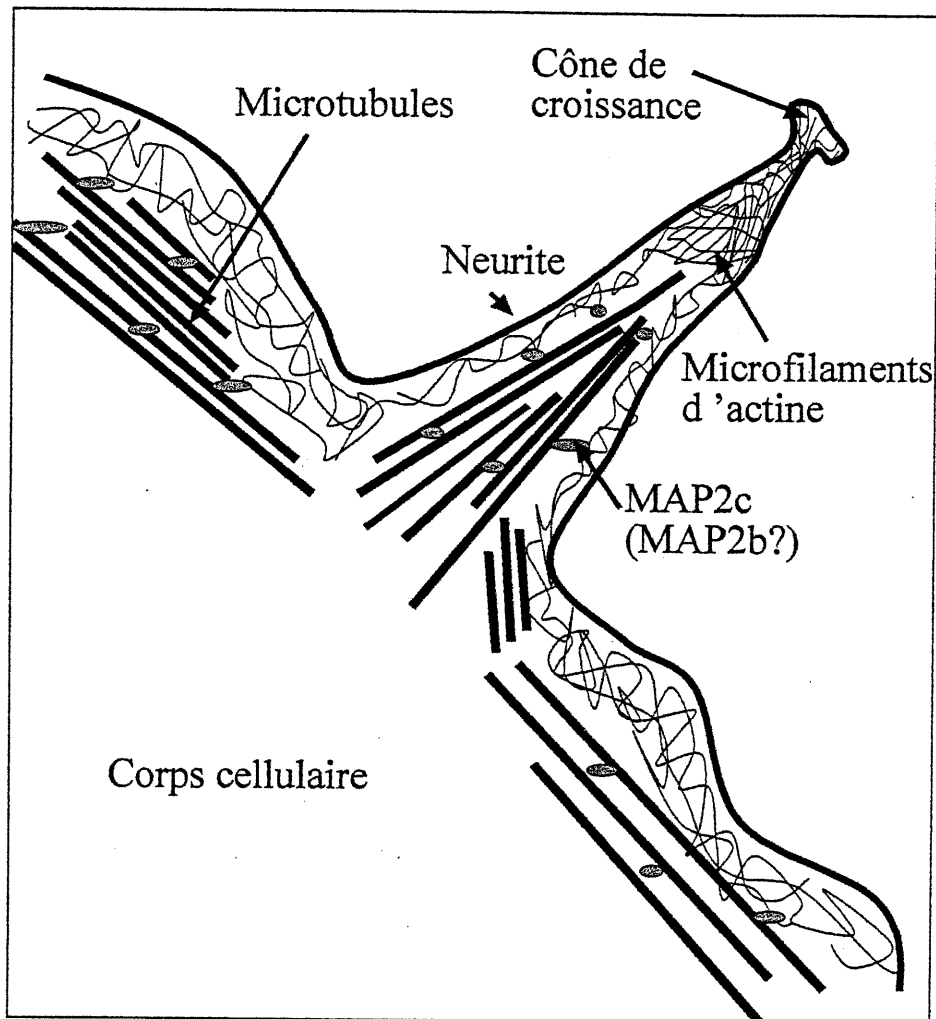


Figure 3 : Implication des différents éléments du cytosquelette dans la formation de neurites

Selon le modèle proposé par Mitchison et Kirschner en 1988 les microtubules et les microfilaments d'actine sont les éléments cytosquelettiques indispensables à la neuritogenèse. Les microfilaments d'actine s'organiseraient d'abord en une sorte de treillis qui permettrait l'orientation des microtubules dans la direction que prendrait le futur prolongement. MAP2c permettrait l'interaction des microfilaments d'actine avec les microtubules tandis que MAP2b stabiliserait les microtubules une fois qu'il seraient dans la bonne direction.

MAP2 et le remodelage des dendrites

Il est bien connu que lors de l'apprentissage, il y a formation de nouvelles synapses entre les neurones. Cela nécessite une réorientation de certains prolongements vers de nouvelles cibles et ainsi, un remodelage de l'architecture cytosquelettique. Il a été démontré chez des rats en situation d'apprentissage que MAP2 serait un des modeleurs du cytosquelette. Le niveau total de MAP2 ne varie pas en situation d'apprentissage. Toutefois, les produits de dégradation de MAP2 augmentent pendant cette période (Woolf et al. 1999). Ceci indique qu'il y a autant de MAP2 dégradée que de MAP2 synthétisée. La cellule dégraderait donc les MAP2 du prolongement à éliminer, ce qui aurait pour conséquence de déstabiliser les microtubules. Simultanément, elle fabriquerait de la nouvelle MAP2 pour stabiliser les nouveaux microtubules dans le prolongement naissant.

L'expression de MAP2 induit la formation de prolongements cytoplasmiques dans des cellules non neuronales

Le système baculoviral :

Les cellules *Spodoptera frugiperda* (Sf9) proviennent des lignées *Lepodopteran*. Ce sont des cellules ovariennes immatures. Les cellules Sf9 sont l'hôte naturel du virus polyèdre nucléaire *Autographa californica*, un membre de la famille des *Baculoviridae* (Kosik et McConlogue 1994). Il est courant d'utiliser ce virus pour insérer un gène dans les cellules Sf9. En effet, on peut mettre le gène ou la séquence d'ADN désiré(e) sous le contrôle du promoteur viral polyhedrine qui, normalement, contrôle l'expression de la protéine polyhedrine. Cette protéine est nécessaire au cycle naturel du virus mais est non essentielle à sa réplication et sa capacité d'infection (Kosik et McConlogue 1994).

Les difficultés rencontrées dans la manipulation de l'expression de gènes dans les neurones et la complexité de la différenciation neuronale sont des obstacles importants à la compréhension de la fonction d'une protéine. L'utilisation du système baculoviral permet d'étudier l'implication d'une seule protéine à la fois sur la neuritogénèse par exemple (Knowles et al. 1994). Un autre avantage du système baculoviral est que les cellules Sf9 subissent des changements morphologiques suite à l'expression de certaines

protéines; ce qui peut devenir un bon indice de la fonction de cette protéine. Par exemple, l'expression d'une sous-unité catalytique de la protéine kinase A induit la formation de prolongements cytoplasmiques par les cellules Sf9. (Cheley et al. 1992). La formation de prolongements cytoplasmiques par les cellules Sf9 implique une réorganisation des microtubules mais également des microfilaments d'actine (Knowles et al. 1994). Le système baculoviral devient donc un modèle très intéressant pour l'étude de la fonction des MAPs et leur implication lors de la neuritogénèse.

L'expression de Tau et de MAP2 dans les cellules Sf9 a permis de raffiner les différences de fonctions entre ces deux protéines de liaison aux microtubules (Kosik et McConlogue 1994; Knops et al. 1991; Leclerc et al. 1996; Knowles et al. 1994). Une étude de co-expressions des MAPs (Tau, MAP2c et MAP2b) dans les cellules Sf9 a permis de montrer que ces dernières compétitionnent pour les éléments du cytosquelette. Cette compétition résulte en un différent pattern de production de prolongements par les cellules Sf9 (Boucher et al. 1999).

Expression de MAP2 dans les cellules Sf9

Pour étudier la fonction spécifique de MAP2b et MAP2c dans la différenciation neuronale, les deux isoformes de MAP2 ont été exprimées dans les cellules Sf9. Ces cellules n'expriment pas MAP2 de façon constitutive. Lorsqu'on exprime l'une ou l'autre des isoformes de MAP2 dans ces cellules, leur phénotype varie en fonction de l'isoforme exprimée. En effet, 60% des cellules Sf9 qui expriment MAP2c présentent des prolongements fins, longs et multiples. Quant à MAP2b, elle induit la formation d'un prolongement unique, court, trapus et cela dans seulement 20% des cellules (Leclerc et al. 1996). Ceci suggère des rôles différents pour les deux isoformes dans l'élaboration du phénotype neuronal.

Maladies reliées au cytosquelette des neurones

La maladie d'Alzheimer est caractérisée par deux types de lésion : les plaques séniles contenant les protéines amyloïde, et les enchevêtrements neurofibrillaires contenant la protéine Tau hyperphosphorylée. (Kosik et al. 1995; Lee 1995). En 1995, Kosik et al.

ont montré que les protéines précurseurs de l'amyloïde, trouvées dans les plaques séniles, pouvaient stimuler l'activité mitogène de la protéine kinase MAPK. Cette activité résulterait en une hyperphosphorylation de la protéine Tau. L'hyperphosphorylation de la protéine Tau conduirait à la formation de filaments intra-neuronaux qui conduirait à l'élaboration de l'enchevêtrement neurofibrillaire (Kosik et al. 1995).

La sclérose amyotrophique latérale (ALS) est une maladie neurodégénérative des neurones moteurs. Les neurones atteints présentent des accumulations de neurofilaments dans les corps cellulaires et dans la région proximale des axones. Des études récentes ont suggéré que l'accumulation de neurofilaments pourrait être une des causes de la maladie (Julien 1995 (48)). En effet, des souris transgéniques surexprimant une protéine de neurofilaments présentent une dégénérescence des motoneurones. De plus, des mutations ont été identifiées dans le gène codant pour la chaîne lourde de neurofilaments (NF-H) chez certains patients souffrant de ALS. Enfin, des études ont montré des anomalies dans le transport axonal des motoneurones de souris transgéniques surexprimant NF-H. Cela pourrait empêcher le transport d'éléments nécessaires à la survie de l'axone; ce qui causerait ainsi l'effondrement axonal et la dénervation progressive du muscle (Julien 1995).

Des changements dans la composition moléculaire du cytosquelette ont également été observés dans le cerveau de patients souffrant de la schizophrénie. Une diminution de l'expression de MAP2 et MAP1 dans le subiculum et le cortex enthorinal de l'hippocampe a été notée (Arnold et al. 1991). Toutefois, il a été rapporté récemment qu'au lieu d'une diminution totale de MAP2 dans ces structures, il y a une augmentation de MAP2 non phosphorylée. Ceci suggère qu'il pourrait y avoir un assemblage non fonctionnel du cytosquelette (Cotter et al. 1997).

Objectifs du travail

Comme mentionné plus tôt, les isoformes de MAP2 jouent un rôle au niveau de la différenciation, de la régénération et du remodelage morphologique d'un neurone. De plus, des isoformes distinctes de MAP2 semblent être impliquées dans ces différents événements cellulaires. Pour mieux comprendre le rôle respectif des isoformes de

MAP2, il est nécessaire de mieux caractériser les différents domaines fonctionnels de ces protéines. Dans la présente étude, nous nous sommes intéressés, plus particulièrement, à l'identification des domaines qui leur confèrent la capacité d'induire la formation de prolongements cytoplasmiques. La présente étude s'est concentrée sur les isoformes, MAP2b et MAP2c puisqu'elles sont les isoformes les mieux caractérisées au niveau de leur pattern d'expression de même qu'au niveau de leur structure. Elles sont constituées de deux domaines majeurs (Garner and Matus 1988): un domaine de liaison aux microtubules (dont l'une des fonctions, lier les microtubules, est connue) et un domaine de projection dont la fonction n'est pas connue. MAP2b diffère de MAP2c par l'insertion d'une séquence de 1372 acides aminés dans son domaine de projection. La présente étude vise à déterminer le rôle respectif du domaine de liaison aux microtubules commun aux deux isoformes, du domaine de projection de MAP2c et du domaine de projection de MAP2b dans la production de prolongements cytoplasmiques. De plus, nous nous sommes intéressés à élucider le rôle de la séquence additionnelle de 1372 acides aminés présente dans le domaine de projection de MAP2b dans l'élaboration de prolongements cytoplasmiques par cette protéine.

Pour ce faire,

- 1) Nous avons produit trois formes mutantes de MAP2c et MAP2b: Prob et Proc et Mt qui correspondent respectivement au domaine de projection de MAP2b, à celui de MAP2c et au domaine de liaison aux microtubules commun à MAP2b et MAP2c (Figure II-1). Ces formes mutantes ont été exprimées dans les cellules Sf9 puisque l'expression de MAP2c et MAP2b induit la formation de prolongements cytoplasmiques dans ces cellules (Leclerc et al. 1996)). Leur capacité à induire la formation de prolongements cytoplasmiques a été analysée par une étude morphologique quantitative.
- 2) Nous avons également produit trois formes mutantes de MAP2b qui contiennent une délétion à l'intérieur de la séquence additionnelle de 1372 acides aminés du domaine de projection de MAP2b. Ces formes mutantes ont également été exprimées dans les cellules Sf9 pour analyser leur capacité à induire la formation de prolongements cytoplasmiques.
- 3) Finalement, nous avons examiné la réorganisation du cytosquelette induite par ces différentes formes mutantes de MAP2c et MAP2b dans les cellules Sf9 en microscopie à fluorescence et confocale.

Chapitre deuxième

The process outgrowth activity of MAP2b is regulated
by its projection domain in Sf9 cells

soumis à

Molecular Biology of the Cell

**The process outgrowth activity of MAP2b is regulated by its projection
domain in Sf9 cells**

D. Bélanger, S. Cornibert, C. Abi Farah and N. Leclerc

Département de pathologie et biologie cellulaire, Université de Montréal, Montréal,
Québec, Canada, H3T 1J8

Corresponding author:

Dr Nicole Leclerc

Département de pathologie et biologie cellulaire

Université de Montréal

C.P.6128, Succ. Centre-ville

Montréal, Québec

Canada H3C 3J7

Phone: (514)-343-5657

Fax: (514)-343-5755

email: 

ABSTRACT

In neurons, the expression of microtubule-associated protein-2 (MAP-2) is correlated to neurite outgrowth in developing brain and to maintenance of neuronal shape in adult brain. MAP2b, the mature isoform of MAP2, and MAP2c, the juvenile isoform, differ by a sequence of 1372 amino acids inserted in the MAP2b projection domain. In the present study, we demonstrate that this additional sequence of 1372 a.a. decreases the capacity of MAP2b to induce process outgrowth. To investigate the role of this sequence in process outgrowth, we engineered truncated forms of MAP2b that correspond to the projection domain of MAP2b, the projection domain of MAP2c and to the microtubule-binding domain common to MAP2c and MAP2b. These constructs were expressed in Sf9 cells using baculoviral expression vectors. In a previous study, we demonstrated that MAP2c induces the formation of multiple processes in Sf9 cells whereas MAP2b induces the formation of a single process. Moreover, 60% of the cells expressing MAP2c have processes compared to 20% of MAP2b expressing cells. Here, we show that the expression of the projection domain of either MAP2b or MAP2c did not induce formation of process outgrowth in Sf9 cells. On the other hand, the expression of the microtubule-binding domain gave rise to a higher number of cells with processes compared to full-length MAP2b but a lower number of processes per cell compared to full-length MAP2c. This indicates that the sequence of the projection domain comprised in MAP2c is involved in the formation of multiple processes whereas the additional sequence of 1372 a.a. found in the projection domain of MAP2b exerts a negative effect on the induction of process outgrowth in Sf9 cells. Indeed, truncated forms of MAP2b that had a partial deletion in this additional sequence induced a higher number of cells with processes than MAP2b. Collectively, the above results suggest that the projection domain regulates the process outgrowth activity of the microtubule-binding domain in both MAP2c and MAP2b.

INTRODUCTION

Neurons differentiate into polar cells by elaborating two types of cytoplasmic processes: dendrites and axons. Differentiation of dendrites and axons follow specific steps in vitro (Dotti et al., 1988). At the early stage of differentiation, the neuron develops lamellipodia that consolidate to form cytoplasmic processes called minor neurites. One of these minor neurites elongates faster than the others and becomes the axon. The remaining minor neurites differentiate into dendrites. Many studies showed the implication of the microtubule-associated protein-2 (MAP2) in this neuritogenesis. The suppression of MAP2 expression in primary neuronal culture inhibits the formation of minor neurites (Caceres et al., 1992). Moreover, the inhibition of MAP2 expression in ECP19 cells which undergo neuronal differentiation in presence of retinoic acid inhibits the development of the characteristic morphological phenotype of neurons as well as the withdrawal of these cells from the cell cycle (Dinsmore and F., 1991). At a later stage of differentiation, the expression of MAP2 is enriched in dendrites (Ludin and Matus, 1993). Suppression and degradation of MAP2 was correlated to dendritic morphological remodeling in adult neurons (Sharma et al., 1994; Faddis et al., 1997). Taken together, the above observations indicate that there is a switch of MAP2 function from promoting neurite outgrowth to stabilization of dendritic shape during neuronal differentiation.

During neuronal differentiation, MAP2 function is accomplished by a diversity of isoforms of different sizes. There exists at least four isoforms of the protein MAP2: MAP2a, MAP2b, MAP2c and MAP2d. These isoforms are generated by alternative splicing. MAP2a and MAP2b, the high molecular weight isoforms, are the dominant isoforms found in the neurons of the adult CNS (Chung et al., 1996). They are only expressed in dendrites. MAP2b is expressed before MAP2a during neuronal differentiation (Tucker, 1990). Recently, new variants of the high molecular weight MAP2 have been identified that contain additional sequences in the amino-terminal and in the carboxyl-terminus (Couchie et al., 1996; Forleo et al., 1996; Kalcheva et al., 1997). They are expressed in the spinal cord and in the dorsal root ganglia. MAP2c and MAP2d, the low molecular weight isoforms of MAP2 differ by the fact that MAP2d contains 4 imperfect repeats in the carboxyl-terminus responsible for microtubule assembly whereas MAP2c has three repeats (Ferhat et al., 1994b). MAP2c is found both in growing dendrites and axons (Tucker, 1990). Interestingly, it remains expressed in neurons that have the capacity to regenerate in the adult CNS (Tucker, 1990). In contrast to MAP2c,

the expression of MAP2d is higher in adult brain and is preferentially found in glia (Ferhat et al., 1994a).

We have concentrated our study on MAP2b and MAP2c, the two best characterized isoforms of MAP2. MAP2c is a 467 amino acid (a.a.) protein whereas MAP2b is a 1828 a.a. protein that contains an additional sequence of 1372 a.a. in the amino-terminus (Neve et al., 1986; Papandrikopoulou et al., 1989). This splicing event shifts the apparent molecular weight of MAP2b from 70 KDa to 280 KDa. These MAP2 isoforms are composed of two major domains: the microtubule-binding domain and a domain that projects at the surface of the microtubules called the projection domain (Lewis et al., 1988; Lewis et al., 1989). The function of this domain is still elusive. The insertion of 1372 a.a. in this domain indicates that it plays an important role in neuronal function in adult brain.

The most well characterized function of MAP2 isoforms is their ability to promote microtubule assembly and to stabilize microtubules (Ludin and Matus, 1993). They also induce microtubule bundling but the spacing between microtubules is less in MAP2c-induced microtubules than in MAP2b-induced microtubules (Chen et al., 1992; Leclerc et al., 1996). Other than their effect on microtubules, we and others have shown that MAP2b and MAP2c interact with F-actin. If MAP2b and MAP2c can both bind actin microfilaments only MAP2c can efficiently organize them to induce the formation of actin-rich lamellae (Cunningham et al., 1997). Since microtubules and F-actin interact to coordinate neurite outgrowth, the above results suggest that MAP2c and MAP2b might act as molecular linkers between these cytoskeletal elements during neurite formation.

In previous studies, by using the baculovirus expression system, we have shown that MAP2c is a lot more efficient than MAP2b to induce process outgrowth. Indeed, the expression of MAP2c in Sf9 *Spodoperda frugiperda* cells resulted in the formation of multiple processes whereas that of MAP2b resulted in the formation of a single process (Leclerc et al., 1993; Leclerc, et al., 1996). Moreover, 60% of the cells expressing MAP2c present processes compared to 20% of the cells expressing MAP2b (Leclerc, et al., 1996). From these results, it appears that the additional sequence of 1372 a.a. contained in the projection domain of MAP2b impairs the formation of process outgrowth in Sf9 cells.

In the present study, we used the baculovirus expression system to characterize the functional domain(s) of MAP2b and MAP2c involved in the formation of process outgrowth. We generated truncated forms of MAP2b and MAP2c and expressed them in

Sf9 cells. Our results indicate that the projection domain regulates the process outgrowth activity of MAP2b and MAP2c in Sf9 cells. These data allow us to propose a model of structural configuration of the projection domain that could determine the activity of MAP2 isoforms.

MATERIALS AND METHODS

Baculoviral recombinants

All MAP2 constructs contain a 6xHis tag at the N-terminal. The engineering of MAP2-His fusion protein was performed in three steps. First, the full-length MAP2b cDNA cloned in the baculovirus expression vector pVL1392 was digested with BamHI and cloned into the sites BamHI and BglII of the vector pBacPAK His2 (Clontech, Palo Alto, CA, USA) (MAP2b-Bac PAK His2). Second, the non-coding sequence of MAP2b was deleted to engineer the His fusion protein. This was done by adding by PCR a BamHI site in 5' of the coding sequence of MAP2b. All PCR products were generated by using the Pfu enzyme (Stratagene, La Jolla, CA, USA) and were cloned into the blunt end vector Pstblue (Novagen). The PCR product, cloned in the Pstblue vector, containing the BamHI site, was digested with BamHI and XhoI and cloned into the pBacPAK His2 vector (PCR1-BacPAK His2). Third, the PCR1-Bac PAK His2 was digested with NcoI (this site is comprised in the MAP2b sequence amplified by PCR) and inserted in the MAP2b-pBacPak His2 that was also digested with NcoI.

Five MAP2b constructs having a deletion of nucleotides 656 to 1921 (MAP2b-1), 1921 to 3320 (MAP2b-2), 3329 to 4772 (MAP2b-3), 1 to 4772 (Mt) and 4772 to 5881 (Prob) were produced. To delete the nucleotides 656 to 1921 (MAP2b-1), a ScaI site was inserted in 3' of nucleotide 656 by PCR. A PCR product containing the MAP2b sequence from nucleotide 378 to 656-ScaI (PCR-C1) was cloned into the blunt end Pstblue vector. The insertion of PCR-C1 into the MAP2b-BacPAK His2 vector was done in three steps. First, the sequence from 1 to 5471 of MAP2b-His sequence was subcloned into the BamHI and XhoI sites of the Bluescript vector (MAP2b₁₋₅₄₇₁-BS). The nucleotides from 378 to 1921 of the MAP2b sequence were deleted by digestion of MAP2b₁₋₅₄₇₁-BS with KasI and ScaI. Second, the PCR-C1 cloned into the Pstblue vector was digested with KasI and ScaI and subcloned into the sites KasI and ScaI of the MAP2b₁₋₅₄₇₁-BS vector (C1-MAP2b₁₋₅₄₇₁-BS). Third, the sequence of MAP2b containing the deletion from 656 to 1921 was cut from the MAP2b₁₋₅₄₇₁-BS by digestion with BamHI and XhoI and re-inserted in the MAP2b-BacPAK His2 vector.

To delete the nucleotides 1921 to 3329 (MAP2b-2), a XbaI site was inserted in 3' of nucleotide 1921 by PCR. A PCR product containing the MAP2b sequence from nucleotides 378 to 1921-XbaI (PCR-C2) was cloned into the vector Pstblue. The insertion of PCR-C2 into MAP2b-BacPAK His2 vector was done in three steps. First the

nucleotides 1 to 3121 of MAP2b-His sequence were subcloned into the Bluescript vector (MAP2b₁₋₃₁₂₁-BS). Second, the PCR-C2 cloned into the PSTblue vector was digested with KasI and XbaI and subcloned into the corresponding sites of MAP2b₁₋₃₁₂₁-BS (C2-MAP2b₁₋₃₁₂₁-BS). Third, the sequence of MAP2b containing the deletion from 1921 to 3329 was cut from the C2-MAP2b₁₋₃₁₂₁-BS by digestion with BamHI and XbaI and re-inserted in the MAP2b-BacPAK His2 vector.

To delete the nucleotides 3329 to 4472 (MAP2b-3), a XbaI site was inserted in 3' of nucleotide 4472 by PCR. A PCR product containing the MAP2b sequence from nucleotides 3329 to 4472-XbaI (PCR-C3) was cloned into the blunt end Pstblue vector. The insertion of PCR-C3 into MAP2b-BacPAK His2 vector was done in three steps. First, the nucleotides 3329 to 5513 of MAP2b-His sequence was subcloned into the Pstblue vector (MAP2b₃₃₂₉₋₅₅₁₃-Pb) at the SphI and XbaI sites. Second, the PCR-C3 cloned into the Pstblue vector was digested with SmaI and XbaI and subcloned into the corresponding sites of MAP2b₃₃₂₉₋₅₅₁₃-Pb (C3-MAP2b₃₃₂₉₋₅₅₁₃-Pb). Third, the sequence of MAP2b containing the deletion from 3329 to 4772 was cut from the C3-MAP2b₃₃₂₉₋₅₅₁₃-Pb by digestion with XbaI and SphI and re-inserted in the MAP2b-BacPAK His2 vector.

A truncated form of MAP2b corresponding to the microtubule-binding domain (Mt) was generated by deleting the nucleotides 1 to 4772. To do so, a BamHI site was inserted at the 4765 nucleotide by PCR. MAP2b-pBacPAK His2 was digested with BamHI and SphI. The deleted sequence was replaced by the PCR product digested with the same restriction enzymes.

A truncated form of MAP2b corresponding to the projection domain of MAP2b (Prob) was produced by deleting the nucleotides 4772 to 5881. First, a NotI site was inserted at the 4772 nucleotide of the MAP2b sequence by PCR. MAP2b-pBacPAK His2 was digested with NotI and XbaI. The deleted sequence was replaced by the PCR product digested with the same restriction enzymes.

We also engineered a truncated form that corresponds to the projection domain of MAP2c (Proc) by deletion of the nucleotides 1 to 444. To do so, the MAP2c sequence was inserted into the pBacPAK vector. MAP2c was removed from the pCMV vector by digestion with NotI and inserted into the pBacPAK His2 at the NotI site. The start codon of MAP2c and the 5' untranslated region was removed. To do so, a BamHI was inserted at the start codon of MAP2c by directed mutagenesis. MAP2c-pBacPAK was digested with BamHI and PstI. The deleted part was replaced by the PCR product digested with the

same restriction enzymes. To generate a truncated form of MAP2c corresponding to its projection domain (nucleotides 1 to 444), a NotI site was inserted by directed mutagenesis at the nucleotide 444 of the MAP2c sequence. MAP2c-pBacPAK His2 was digested with NotI and NcoI. The deleted sequence was replaced by the PCR product digested with the same restriction enzymes.

The transfer vector containing the different mutated forms of MAP2b and MAP2c were co-transfected with the *Bsu36I*-digested BacPAK6 viral DNA onto the *Spodoptera frugiperpa* (Sf9) cells using bacfectin (Clontech, Palo Alto, CA, USA).

Cell culture

The Sf9 cells were obtained from the American Type Culture Collection (ATCC # CRL 1711; Rockville, MD). Sf9 cells were grown in Grace's medium (Gibco BRL, Burlington, Ontario, Canada) supplemented with 10% fetal bovine serum (Immunocorp, Montreal, Quebec, Canada) as a monolayer at 27°C. For infection, cells were plated on glass coverslips at a density of 1×10^6 cells/ 60 mm dish. Cells were infected for 72 hours with viral stock at a multiplicity of infection (MOI) of 5.

Immunofluorescence

For immunochemistry, the cells were fixed in 4% paraformaldehyde in phosphate-buffered saline (PBS) for 20 min. Then the cells were permeabilized with 0.2% Triton X-100 in PBS for 5 min. The expression of the truncated forms of MAP2b and MAP2c except MT was revealed by using a monoclonal antibody directed against MAP2 (clone HM2, dilution 1:200) purchased from Sigma (Mississauga, Ontario, Canada). The Mt mutant was revealed by the monoclonal antibody 46.1 directed against the microtubule binding domain of MAP2 (kindly provided by Dr. V. Lee, University of Pennsylvania, USA). To visualize the microtubule reorganization, a monoclonal antibody directed against α -tubuline (Sigma, dilution 1:500) was used. The actin reorganization was visualized with Rhodamin-phalloïdine (Molecular Probe inc. Eugene, Oregon, USA), at a dilution of 1:200. We used the following secondary antibodies (Jackson ImmunoResearch Laboratories Inc., Bio/Cam, Mississauga, Ontario, Canada): the anti-mouse Fab fragment conjugated to rhodamine (dilution 1:500) and a donkey anti-mouse conjugated to FITC (dilution 1:500). All these antibodies were diluted in PBS plus 5% BSA. Incubations were carried out at room temperature for 1h. After three washes in PBS, the coverslips were mounted in moviol and visualized by fluorescence microscopy.

The expression of the truncated forms of MAP2 in the Sf9 cells was confirmed by Western blot. To do so, the transfected cells were centrifugated at 1000 rpm for 3min. The pellets were resuspended into PBS containing protease inhibitors (antipain, aprotinin, leupeptin, EDTA, PMSF at a dilution of 1:100 and DFP at a dilution of 1:10). An equal volume of sample buffer was added to the cell suspension and then it was boiled for 5 min. The proteins were separated on a 7.5% polyacrylamide gel and transferred on nitrocellulose membrane. The antibodies used to visualized the proteins were HM2 (Sigma) 46.1(kindly provided by Dr. V. Lee, University of Pennsylvania) or with an anti-His antibody (Santa Cruz, Santa Cruz, CA, USA). The secondary antibodies were conjugated to HRP (horseradish peroxidase) (Jackson Immunoresearch Laboratories Inc., Bio/Cam, Mississauga, Ontario, Canada) and revealed by chemoluminescence (Roche, Laval, Québec, Canada).

Quantitative morphological analysis

The morphological analysis was performed by two observers. The cells were fixed and stained with an antibody directed against α -tubulin as described above. The secondary antibody was conjugated to HRP. Peroxidase activity was revealed with a solution of 0.05% of 3', 3'-diaminobenzidinetetrahydrochloride (DAB). The quantitative morphological analysis was performed using the Northern Eclipse software (Empix Imaging, Mississauga, Ontario, Canada). Three sets of experiments were analyzed. The morphological phenotypes observed with the different truncated forms of MAP2 were highly reproducible from one set of experiments to another. To evaluate the number of processes per cell, 150 cells were measured for each truncated form of MAP2 in each set of experiment. To analyze the length of process and the total length of processes per cell, 50 cells were used for each truncated form of MAP2 in each set of experiment.

Statistical analysis

To analyze the reproducibility of the data from one set of experiment to another, a one-way ANOVA followed by the Sheffe test was performed. The length of process and the total length of processes per cell were analyzed by one-way ANOVA followed by the Sheffe test. Chi-square tests were performed to analyze the number of processes per cell. For all measurements, comparisons between the different MAP2 constructs were significant with a $p < .05$.

RESULTS

The projection domain of MAP2b negatively regulates the capacity of the microtubule-binding domain to induce process outgrowth in Sf9 cells

We have produced recombinant baculovirus that contain either the projection domain of MAP2b (Prob), the projection domain of MAP2c (Proc) or the microtubule-binding domain (Mt) that is common to MAP2b and MAP2c (Figure 1). The expression of these truncated forms was analyzed by immunoblotting in Sf9 cells. Each mutant was found to migrate at its expected molecular weight (Figure 2). The ability of each of these constructs to induce process outgrowth was examined by expressing them in Sf9 cells. As reported before, full-length MAP2b induce the formation of one process whereas MAP2c has the tendency to induce the formation of multiple processes (Figure 3). The expression of the truncated form that corresponds to the projection domain of MAP2b (Prob) did not induce process outgrowth. Similar results were obtained with the truncated form that corresponds to MAP2c projection domain (Proc). In contrast, the microtubule-binding domain (Mt) induced formation of cytoplasmic processes. A quantitative morphological analysis was carried out to determine whether the pattern of process outgrowth induced by Mt was reminiscent of that induced by MAP2c or MAP2b. The pattern of process outgrowth was analyzed according to three parameters: number of processes per cell, number of cell with processes and process length. Interestingly, in the cells expressing Mt, the number of processes per cell was significantly different from that of MAP2c-expressing cells. Indeed, 20% of the cells had multiple processes compared to 37.1% for MAP2c-expressing cells (Figure 4). This indicates that the projection domain of MAP2c is involved in the production of multiple processes by Sf9 cells. 53% of the cells had processes compared to 14% and 66% of MAP2b- and MAP2c-expressing cells respectively (Figure 1). This demonstrates that the projection domain of MAP2b negatively regulates the capacity of the microtubule-binding domain to induce process outgrowth whereas the projection domain of MAP2c appears to increase its capacity to initiate process outgrowth. Collectively, these results suggest that the additional sequence of 1372 a.a. in the projection domain of MAP2b impairs the positive effects of the 150 a.a. common to the MAP2b and MAP2c projection domain on the capacity of the microtubule-binding domain to induce process outgrowth.

Regulatory regions of Prob on process outgrowth activity of the microtubule-binding domain

To identify which region(s) of the 1372 a.a. sequence is involved in regulating the process outgrowth activity of Mt, we subdivided this sequence into three portions of equal size corresponding to the region adjacent to the N-terminal common to MAP2c and MAP2b (MAP2b-1), to the median region (MAP2b-2) and to the region adjacent to the microtubule-binding domain (MAP2b-3). MAP2b truncated forms that contain deletions of one of these regions were expressed in Sf9 cells (Figure 1). MAP2b-1 is deleted of the amino acids 147a.a. to 569a.a., 147 a.a. is the amino acid located at the splicing site of MAP2c. MAP2b-2 has a deletion from 569 a.a to 1035 a.a.. This deleted sequence includes a phylogenetic conserved sequence in MAP2b projection domain extending from 650 to 940 (Kindler et al., 1990). MAP2b-3 is deleted from the 1035 to 1519 a.a., 1519 corresponding to the splicing site of MAP2c. This deleted sequence contains several proteolytic cleavage sites. These truncated forms were expressed in the baculovirus expression system. Their expression was analyzed by western blotting and each truncated form had the correct apparent molecular weight on SDS-PAGE (Figure 2).

We performed a quantitative morphological analysis as described above to verify whether these truncated forms of MAP2b induced different patterns of process outgrowth in Sf9 cells. As noted for MAP2b, they had the tendency to induce one process per cell (Figures 3, 4). However, the percentage of cells with processes was significantly higher than that of MAP2b-expressing cells (Figure 1). Both MAP2b-1 and MAP2b-2 induced two times more cells with processes than MAP2b (Figures 3, 4). In particular, there was an increase of cells with one or two processes (Figure 4). In the case of MAP2b-3, the number of cells with processes was three times higher than MAP2b (Figure 4). The number of processes per cell was significantly higher in MAP2b-3 than in MAP2b-1- and MAP2b-2-expressing cells. Indeed, 30% of the MAP2b-3-expressing cells had one process compared to 20% of the MAP2b-1- and MAP2b-2-expressing cells. There was also an increase of cells with two processes: MAP2b-1 (5.3%), MAP2b-2 (7.5%) and MAP2b-3 (9.1%). From these observations, one can conclude that the amino acids 1035 to 1519 deleted in MAP2b-3 have the most important inhibitory effects on the formation of process outgrowth by MAP2b in Sf9 cells. Although all the deletions in the 1372 a.a. sequence resulted in a higher number of cells with processes, none of the deletion could lead to an increased number of cells having multiple processes.

The process length was analyzed for each truncated form of MAP2b and MAP2c (Figure 5). MAP2b and MAP2c induced relatively short processes of $36 \pm 1.3 \mu\text{m}$ and $35.9 \pm 5.9 \mu\text{m}$ respectively. Mt tended also to induce short processes ($35.2 \pm 1.7 \mu\text{m}$). Deletion in the 1372 a.a. sequence of MAP2b projection domain had an effect on process length. The cells expressing either the truncated forms, MAP2b-1 and MAP2b-3, presented significantly longer processes than MAP2b. However, the cells expressing the truncated form, MAP2b-2, had a process length similar to that of MAP2b. From the above observations, it appears that the additional sequence of 1372 a.a. in the projection domain of MAP2b not only is involved in determining the number of processes per cell but also exerts an effect on process length.

Distribution of the microtubules and actin microfilaments in Sf9 cells expressing MAP2c and MAP2b truncated forms

In a previous study, we showed that MAP2c and MAP2b promote the formation of microtubules and the reorganization of the actin microfilaments (F-actin) (Boucher et al., 1999). Briefly, in MAP2c-expressing cells having multiple processes, the microtubules radiate tangentially from the cell surface to form processes. In these cells, F-actin co-localizes with the microtubules at the emerging site of processes (Figure 6A). In MAP2b-expressing cells developing one process, a thick bundle of microtubules originating in the cell body extend into the process. F-actin is found in the cell body as well as along the process (Figure 6A). In MAP2b-expressing cells without processes, microtubules are organized in a thick bundle that form a ring under the plasma membrane. Small aggregates of F-actin were observed under the plasma membrane and in the cytoplasm (Figure 6A).

We analyzed the distribution of microtubules and F-actin in cells expressing the different truncated forms of MAP2b and MAP2c (Figure 6A). In cells expressing Mt, several thin bundles of microtubules are found in the cell body that form a thick bundle at the hillock region of the process and extends into the process. Aggregates of F-actin were found in the cell body as well as along the process. In cells having multiple processes, the distribution of the microtubules and F-actin is reminiscent of that found in MAP2c-expressing cells presenting multiple processes. In MAP2b-1, MAP2b-2 and MAP2b-3-expressing cells, a thick bundle of microtubules was found in the cell body that extended in the process at one pole of the cell body as previously described for MAP2b (Leclerc, et al., 1996). In these cells, F-actin was found in the cell body and along the process. In

cells expressing either of these MAP2b truncated forms that did not have processes, microtubules formed a ring under the plasma membrane and F-actin aggregates were noted at the plasma membrane and in the cytoplasm as reported for full-length MAP2b (Boucher, et al., 1999). In cells expressing Prob, there was no formation of microtubules. Interestingly, Prob expression was concentrated in the cell periphery. In these cells, F-actin formed a ring under the plasma membrane and seemed to co-localize with Prob (Figure 6B). Proc expression had also the tendency to be concentrated in the cell periphery and to co-localize with F-actin (Figure 6B). Finally, F-actin nuclear staining was often noted in cells infected with any truncated form of MAP2b and MAP2c as noted in wild-type baculovirus infection (Charlton and Volkman, 1991). From the above observations, it appears that Mt contains the domains to reorganize the cytoskeleton and induce process outgrowth. Mt not only promoted microtubule formation as expected but was able to redistribute F-actin in Sf9 cells. Prob and Proc co-localized with F-actin at the cell periphery. Therefore, all these domains might contain an actin-binding domain.

DISCUSSION

The expression of MAP2b and MAP2c has been correlated to the differentiation of neurites (Ludin and Matus, 1993; Mandell and Banker, 1996). Until now, their respective roles in neuronal differentiation remain elusive. These MAP2 isoforms share a common microtubule-binding domain but in the projection domain, MAP2b has an additional sequence of 1372 a.a. (Papandrikopoulou, et al., 1989). In the present study, we showed that this additional sequence of 1372 a.a. exerts a negative effect on the capacity of the microtubule-binding domain to induce process outgrowth. Indeed, 53% of the cells expressing the microtubule-binding domain common to MAP2c and MAP2b developed processes compared to 20% of MAP2b-expressing cells. In addition, the cells expressing truncated forms that had a deletion in this additional sequence presented a higher percentage of cells with processes than MAP2b. However, the projection domain of MAP2c, a sequence that is also present in MAP2b projection domain, appears to contribute to the formation of multiple processes per cell since the percentage of cells developing multiple processes is significantly lower in cells expressing the microtubule-binding domain than in cells expressing MAP2c.

Regulatory effects of the additional sequence of 1372 a.a in the projection domain of MAP2b on the pattern of process outgrowth in Sf9 cells

In Sf9 cells, formation of microtubules is necessary to promote process outgrowth (Knowles et al., 1994). However, microtubule assembly is not enough to induce process formation in Sf9 cells since MAP2b is able to promote microtubule assembly but has a very low capacity to induce process outgrowth (Leclerc, et al., 1996). Therefore, the fact that complete or partial deletion of the additional sequence of 1372 a.a. in the projection domain of MAP2b enhances process formation suggests that this sequence is involved in other aspects of this event.

F-actin acts as a barrier that guides the elongation of microtubules (Suter and Forscher, 1998). For example, if F-actin is organized in bundles, the microtubules are not able to penetrate this F-actin structure and consequently, they form a ring under the plasma membrane. This was often observed in MAP2b-expressing Sf9 cells (Leclerc, et al., 1996; Boucher, et al., 1999). On the other hand, if F-actin is organized in an isotropic gel, the microtubules are able to penetrate and to elongate to form processes. Along the neurite shaft, F-actin is organized in bundles whereas in the central region of the growth cone, F-actin is arranged in an isotropic gel (Forscher and Smith, 1988; Lewis and Bridgman, 1992). In the neurite shaft, microtubules are organized into bundles that are parallel to the

longitudinal axis of the neurite. When microtubules penetrate the central region of the growth cone, they splay (Tanaka and Sabry, 1995). We previously demonstrated that MAP2c is able to form an isotropic gel of F-actin whereas MAP2b induces the formation of F-actin bundles (Cunningham, et al., 1997). In Sf9 cells, the formation of an isotropic gel by MAP2c would result in splaying the microtubules at the cell periphery and thus formation of multiple processes. On the other hand, if MAP2b induces F-actin bundling, this would considerably reduce the formation of process outgrowth. Indeed, the tendency of MAP2b to induce the formation of a single process could be explained by the fact that F-actin bundling could exert a compressive force on growing microtubules that lead them to elongate in the same direction.

Since MAP2b and MAP2c differ by their projection domain, one can conclude that this domain modulates their effects on F-actin organization. To bundle or cross-link F-actin, a protein has to contain two actin binding domains or to have the capacity to dimerize (Puius et al., 1998). In MAP2 isoforms, only one site of binding to F-actin has been identified until now. It is located in the microtubule-binding domain (Correas et al., 1990). Therefore, it seems that MAP2b and MAP2c have to dimerize to bundle and to form an isotropic gel. However, we showed by confocal microscopy that Proc and Prob often co-localize with F-actin at the cell periphery in Sf9 cells. This indicates that they could interact directly or indirectly with F-actin. In this case, the additional sequence of 1372 a.a. in the MAP2b projection domain could induce a structural modification of the conformation of the projection domain that would modify the spacing and the relation between the actin-binding domain located in the microtubule-binding domain and the one contained in the projection domain. Consequently, this would result in a different organization of F-actin. Proc would favor the formation of an isotropic gel of F-actin by inducing an angle between the filaments whereas Prob would favor the formation of F-actin bundles. The fact that the truncated forms of MAP2b, MAP2b-1 and MAP2b-2 and MAP2b-3 have a higher ability than MAP2b to initiate process outgrowth might be explained by the fact that the deletion had modified the structural conformation of projection domain in a way that would favor the formation of an isotropic gel.

The differential effect of MAP2b and MAP2c on F-actin organization could be explained by the fact that the sequence of 1372 a.a. contains phosphorylation sites that change MAP2 actin binding activity. It is known that phosphorylation affects MAP2 capacity to bundle F-actin (Selden and Pollard, 1983; Yamauchi and Fujisawa, 1988). The median portion of the 1372 a.a. that was deleted in the truncated form, MAP2b-2 (569 to

1035 a.a.), contains a conserved sequence from 650 to 930 in which are found several consensus sequences that could be phosphorylated by either cAMP or CaM kinases (Kindler et al., 1990). Indeed, this region of MAP2 is phosphorylated in vitro (Burns and Islam, 1984; Hernandez et al., 1987). Phosphorylation of MAP2b by CaM kinase inhibits its actin cross-linking activity as well as its microtubule assembly activity (Yamauchi and Fujisawa, 1983; Yamauchi and Fujisawa, 1988). cAMP kinases also decrease its capacity to cross-link actin (Selden and Pollard, 1983). Therefore, this sequence could regulate the interaction of MAP2b with F-actin. The deletion of this sequence could enhance MAP2b interaction with F-actin and thereby increases its capacity to induce process outgrowth as we observed in Sf9 cells with the truncated form MAP2b-2. Moreover, if MAP2b affinity for F-actin is less than that of MAP2c, it is possible that MAP2b is less efficient in competing with the actin-binding proteins present in Sf9 cells and therefore less efficient in reorganizing F-actin. Nonetheless, MAP2b would be able to bind F-actin and to increase its stability as we noted previously in Sf9 cells (Boucher, et al., 1999).

The projection domain extends on the surface of microtubules and thus could interact with other cellular elements that regulate process outgrowth. For example, the additional sequence of 1372 a.a. could modify the binding activity of MAP2b to the elements of the cytoskeleton by interacting with signaling proteins. For example, this sequence contains a binding site for calmodulin which is known to decrease the actin binding activity of MAP2b (Kotani et al., 1985; Kindler, et al., 1990). This calmodulin binding domain was deleted in MAP2b-3, the MAP2b truncated form that gave rise to the highest number of cells with processes. Moreover, the sequence of 1372 a.a. also contains a high affinity phosphatidylinositol-binding site whereas a low affinity binding site is comprised in the microtubule-binding domain (SurrIDGE and Burns, 1994; Burns and SurrIDGE, 1995). A recent study demonstrated that MAP2c process outgrowth activity can be inhibited by the co-expression a subtype of metabotropic glutamate receptors, mGluR1, in Sf9 cells (Huang and Hampson, 2000). mGluR1 induces the stimulation of phosphoinositide (PI) hydrolysis (Pickering et al., 1993). Treatment of the cells with a phospholipase C inhibitor reversed the inhibitory effect of mGluR1 suggesting that the PI pathway was involved in the suppression of MAP2c-mediated process outgrowth in Sf9 cells (Huang and Hampson, 2000). It was proposed that binding of PI to MAP2c reduced its binding to tubulin and consequently microtubule assembly (Yamauchi and Purich, 1987). In Sf9 cells, MAP2b promotes microtubule assembly (Leclerc, et al., 1996). Therefore, if binding of PI to MAP2b is responsible for its low process outgrowth

activity, it regulates a function of MAP2b other than that of microtubule assembly. PI is also known to decrease the binding of MAP2 to actin (Yamauchi and Purich, 1993). Since MAP2b contains a high affinity PI-binding site, its actin-binding activity might be lower than that of MAP2c. Moreover, it was proposed that the binding of PI to MAP2b could induce conformational changes. This could affect MAP2b capacity to induce process formation. Finally, it is possible that the projection domain is involved in interactions with the plasma membrane as shown for the projection domain of tau (Brandt et al., 1995). These interactions could impair process outgrowth in Sf9 cells.

Single process vs multiple processes

The formation of a single process vs multiple processes could be related to polarized cells vs nonpolarized cells. Neurons are polarized cells (Mandell and Banker, 1996). A recent study demonstrated that local instability of F-actin in a single growth cone is necessary for the establishment of neuronal polarity (Bradke and Dotti, 1999). During the first steps of neuronal differentiation, the neuron develops three to four neurites (Dotti, et al., 1988). Later on, one of these neurites elongates faster than the others and becomes the axon. At this step, a neuron becomes polarized. If F-actin was depolymerized by the drug cytochalasin, all the neurites elongated (Bradke and Dotti, 1999). We and others showed that the number of processes induced by the expression of MAP2 isoforms is also influenced by F-actin in nonneuronal cells. Indeed, a depolymerization of F-actin by cytochalasin induced the formation of cytoplasmic processes in a hepatoma cell line that express MAP2c (Edson et al., 1993). In Sf9 cells expressing either MAP2b or MAP2c, depolymerization of F-actin by cytochalasin increases the number of processes per cells (Boucher, et al., 1999). Moreover, a higher number of cells had processes.

In Sf9 cells expressing either MAP2b, MAP2c or a truncated form of these isoforms, the number of processes per cell is related to the distribution of microtubules and F-actin (Leclerc, et al., 1996; Boucher, et al., 1999). In cells presenting multiple processes, the microtubules radiate tangentially to the cell surface to form multiple processes whereas in cells with one process, the microtubules join at the hillock region to form a thick bundle that penetrates into the process. F-actin is concentrated at the sites of emergence of the processes in cells with multiple processes whereas it is found all along the process and in the cell body in cells with one process. In cells presenting multiple processes, there is a co-localization of F-actin and microtubules at the sites of emergence of the processes which suggests a possible interaction between these two cytoskeletal

elements. Since MAP2c is the MAP2 isoform that has the highest tendency to induce multiple processes, this indicates that MAP2c could be involved in an interaction between F-actin and microtubules. Moreover, the expression of the microtubule-binding domain giving a lower percentage of cells with multiple processes suggests that the MAP2c projection domain could mediate this interaction between microtubules and F-actin.

Interestingly, we showed that the microtubule-binding domain induces an identical percentage of cells having one or several processes in Sf9 cells. The microtubule-binding domain promotes microtubule assembly since it contains the 3 repeat sequences responsible for microtubule assembly (Lewis, et al., 1988). In Sf9 cells, the microtubule-binding domain also induced a redistribution of F-actin in Sf9 cells. A previous study demonstrated that a peptide corresponding to the second repeat in the microtubule-binding domain is able to bind F-actin (Correas, et al., 1990). Furthermore, it was shown that the microtubule-binding domain is able to form dimers (Wille et al., 1992). This observation suggests that this domain could promote either the formation of bundles or an isotropic gel of F-actin. This could depend on its cellular concentration. Indeed, it was demonstrated that, at high concentration, MAP2c does not induce the formation of an isotropic gel of F-actin but rather bundles F-actin (Cunningham, et al., 1997). Bundling of F-actin would result in the formation of one process whereas gelation of F-actin would result in the formation of multiple processes. The fact that the microtubule-binding domain induces a lower percentage of cells with multiple processes than MAP2c might indicate that the projection domain of MAP2c favors the formation of an isotropic gel of F-actin. Furthermore, the projection domain might be involved in the interaction of microtubules with other cellular elements involved in the assembly and organization of the microtubules within a cell.

The signaling pathways that regulate the pattern of process outgrowth in Sf9 cells are not well characterized. Our previous work demonstrated that phosphorylation can modulate the pattern of process outgrowth induced by MAP2c. Indeed, treatment of the MAP2c-expressing cells with KN-62, a specific inhibitor of Ca²⁺-calmodulin-dependent protein kinases, results in a shift from multiple to single process formation (Boucher, et al., 1999). These kinases are known to modulate the microtubule- and actin-binding activity of MAP2 (Yamauchi and Fujisawa, 1983; Yamauchi and Fujisawa, 1988). Inhibition of these kinases did not influence the pattern of process outgrowth of MAP2b (Boucher, et al., 1999). Therefore, it appears that MAP2b and MAP2c activity is regulated by different kinases in Sf9 cells. Moreover, differential binding of signaling proteins to

the projection domain of MAP2b and MAP2c could explain the fact that these two MAP2 isoforms give rise to distinct patterns of process outgrowth in Sf9 cells.

Structural conformation of operative and inoperative MAP2b

In Sf9 cells, MAP2b has a lower capacity than MAP2c to induce process outgrowth (Leclerc, et al., 1996). However, the complete or partial removal of the projection domain increases its activity in promoting process outgrowth. These data indicate that the additional sequence of 1372 a.a. could confer to MAP2b a structural conformation that, by steric hindrance and/or intramolecular interactions, results in masking domains that regulate MAP2b process outgrowth activity. Data obtained by rotary shadowing and electron microscopy suggested that the projection domain of MAP2b is an extended semirigid rod-like molecule (Hirokawa, 1982; Voter and Erickson, 1982). However, this domain was shown to be flexible (Woody et al., 1983). Computer-generated secondary structure predictions suggest that the projection domain of MAP2b has a very important stretch of helices separated by short turns (Kindler, et al., 1990). This secondary structure could contribute to its flexibility. Moreover, it seems that the length of the projection domain can vary. Voter and Erickson demonstrated by rotary shadowing that the length of MAP2b varies by folding back (Voter and Erickson, 1982). Moreover, it was shown that the length of the microtubule-binding domain is half of the length of the total protein despite the fact that it contains only one-sixth of the mass (Wille, et al., 1992).

On each side of the 1372 a.a. sequence, there is a proline-rich region which could act as a hinge domain that regulates the position of the projection domain on the surface of the microtubules (Kindler, et al., 1990). Therefore, the proline rich region located at the 5' end of the 1372 a.a. sequence would regulate the position of the projection domain common to MAP2c and MAP2b. The proline rich region located at the 3' end of the 1372 a.a. sequence would control the position of the projection domain with regard to the microtubule-binding domain. When the projection domain would be folded back, it would mask binding sites that mediate the interaction of MAP2b with cytoskeleton or signaling proteins. This situation was reported for ezrin, a protein that links the actin cytoskeleton to the membrane. The folding back of the N-terminal of ezrin masks its binding site for EBP50, the ezrin-radixin-moesin-binding phosphoprotein 50 (Reezek and Bretscher, 1998). Moreover, it was shown that ezrin exists in a dormant form in which its actin binding site located in the C-terminal is masked by the N-terminal that is folded back (Gary and Bretscher, 1995). These conformational changes of ezrin are controlled by

intramolecular interactions. Similarly, MAP2b function could be regulated by intramolecular interactions. Therefore, in adult brain MAP2b would exist in an operative form able to induce process outgrowth and in an inoperative form unable to induce process outgrowth.

Distinct roles of the projection domain of MAP2c and MAP2b in the elaboration of the neuronal phenotype

In a neuronal cell line, it was shown that the projection domain of tau protein is necessary to induce neurite outgrowth. Indeed, the projection domain interacts with the plasma membrane and the impairment of this interaction appears to block neurite outgrowth (Brandt, et al., 1995). MAP2 and tau share 80% homology in the microtubule-binding domain but they have no homology in their projection domain (Lewis, et al., 1988). The microtubule-binding domain of tau is able to induce microtubule assembly and process outgrowth in nonneuronal cells (Léger et al., 1994). Here, we demonstrated that the microtubule-binding domain of MAP2 contains the functional domains to interact with the cytoskeleton and to induce process formation in Sf9 cells. In neurons, process outgrowth is orchestrated by multiple signaling pathways that modulate the activity of cytoskeletal proteins. In this context, the projection domain could serve as a link between the signaling molecules and microtubules and/or F-actin during neurite outgrowth. Recently, it was shown that the proline-rich region in the projection domain of tau interacts with src-family non-receptor tyrosine kinases (Lee et al., 1998). This interaction might be involved in the modulation of the microtubule organization by extracellular signals. Similarly, the projection domain of MAP2, could contain binding sites for signaling proteins that would modulate MAP2 function. Particularly, the additional sequence of 1372 a.a. in the projection domain of MAP2b could contain binding sites for signaling proteins that would regulate the switch from operative to inoperative. In the inoperative form, MAP2b would stabilize the cytoskeleton to maintain the dendritic shape whereas in the operative form, it would promote process outgrowth and remodeling of dendrites.

BIBLIOGRAPHY

- Boucher M, Bélanger D, Beaulieu C, Leclerc N (1999) Tau-mediated process outgrowth is differentially altered by the expression of MAP2b and MAP2c in Sf9 cells. *Cell Motil. Cyto.* 42:257-273.
- Bradke F, Dotti C (1999) The role of local actin instability in axon formation. *Science* 283:1931-1934.
- Brandt R, Léger J, 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.
- Burns R, Islam k (1984) Stoichiometry of microtubule-associated protein (MAP2): tubulin and the localization of the phosphorylation and cysteine residues along the MAP2 primary sequence. *Eur. J. Biochem.* 141:599-608.
- Burns R, Surridge C (1995) The phosphatidylinositol-binding site of microtubule-associated protein MAP2. *Biochem. Soc. Trans.* 23:41-46.
- Caceres A, Mautino J, Kosik KS (1992) Suppression of MAP2 in cultured cerebellar macroneurons inhibits minor neurite formation. *Neuron* 9:607-618.
- Charlton CA, Volkman LE (1991) Sequential rearrangement and nuclear polymerization of actin in baculovirus-infected *Spodoptera frugiperda* cells. *J. Viro.* 65:1219-1227.
- Chen J, Kanai Y, Cowan NJ, Hirokawa N (1992) Projection domains of MAP2 and tau determine spacings between microtubules in dendrites and axons. *Nature* 360:674-676.
- Chung WJ, Kindler S, Seidenbecher C, Garner CC (1996) MAP2a, an alternatively spliced variant of microtubule-associated protein 2. *J. Neurochem.* 66:1273-81.
- Correas I, Padilla R, Avila J (1990) The tubulin-binding sequence of brain microtubule-associated proteins, tau and MAP2, is also involved in actin binding. *Biochem. J.* 269:61-64.
- Couchie D, Chabas S, Mavilia C, Nunez J (1996) New forms of HMW MAP2 are preferentially expressed in the spinal cord. *FEBS Letters* 388:76-79.
- Cunningham C, Leclerc N, Flanagan L, Lu M, Janmey P, Kosik K (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, F. S (1991) Inhibition of MAP2 expression affects both morphological and cell division phenotypes of neuronal differentiation. *Cell* 64:817-826.
- Dotti C, Sullivan C, Banker G (1988) The establishment of polarity in hippocampal neurons in culture. *J. Neurosci.* 8:1454-1468.

- Edson K, Weisshaar B, Matus A (1993) Actin depolymerization induces process formation on MAP2-transfected non-neuronal cells. *Development* 117:689-700.
- Faddis B, Hasban M, Goldberg M (1997) Calpain activation contributes to dendritic remodeling after brief excitotoxic injury in vitro. *J. Neurosci.* 17:951-959.
- Ferhat L, Ben-Ari Y, Khrestchatsky M (1994b) Complete sequence of rat MAP2d, a novel MAP2d isoform. *C.R. Acad.Sci. Paris* 317:304-309.
- Ferhat L, Bernard A, Ribas De Pouplana L, Ben-Ari Y, Khrestchatsky M (1994a) Structure, regional and developmental expression of MAP2d, a MAP2 splice variant encoding four microtubule-binding domains. *Neurochem. Int.* 25:327-338.
- Forleo P, Couchie D, Chabas S, Nunez J (1996) Four repeat high-mol-wt MAP2 forms in the rat dorsal root ganglia. *J. Mol. Neurosci.* 7:193-201.
- Forscher P, Smith SJ (1988) Actions of cytochalasins on the organization of actin filaments and microtubules in a neuronal growth cone. *J. Cell Biol.* 107:1505-1516.
- Gary R, Bretscher A (1995) Ezrin self-association involves binding of an N-terminal domain to a normally masked C-terminal domain that includes the F-actin binding site. *Mol. Biol. Cell* 6:1061-1075.
- Hernandez MA, Wandosell F, Avila J (1987) Localization of the phosphate sites for different kinases in the microtubule-associated protein MAP2. *J. Neurochem.* 48:84-93.
- Hirokawa N (1982) Cross-linker system between neurofilaments, microtubules, and membranous organelles in frog axons revealed by quick-freeze, deep-etching method. *J. Cell Biol.* 94:129-142.
- Huang X, Hampson D (2000) Inhibition of microtubule formation by metabotropic glutamate receptors. *J. Neurochem.* 74:104-113.
- Kalcheva M, Weidenheim KM, Krees Y, Shafit-Zagardo B (1997) Expression of microtubule-associated protein-2a and other novel microtubule-associated protein-2 transcripts in human fetal spinal cord. *J. Neurochem.* 68:383-91.
- Kindler S, Schulz B, Goedert M, Garner C (1990) Molecular structure of microtubule-associated protein 2b and 2c from rat brain. *J. Biol. Chem.* 265:19679-19684.
- Knowles R, Leclerc N, Kosik KS (1994) Organization of actin and microtubules during process formation in tau-expressing Sf9 cells. *Cell Motil. Cyto.* 28:256-264.
- Kotani S, Nishida E, Kumagai H, Sakai H (1985) Calmodulin inhibits interaction of actin with MAP2 and tau, two major microtubule-associated proteins. *J. Biol. Chem.* 260:1.
- Leclerc N, Baas PW, Garner G, Kosik KS (1996) Juvenile and mature MAP2 isoforms induce distinct cellular morphologies. *Mol. Biol. Cell* 7:443-455.

- Leclerc N, Kosik KS, Cowan N, Pienkowski TP, 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 G, Newman S, Gard D, Band H, Panchamoorthy G (1998) Tau interacts with src-family non-receptor tyrosine kinases. *J. Cell Sci.* 111:3167-3177.
- Léger J, Brandt R, Lee G (1994) Identification of tau protein regions required for process formation in PC12 cells. *J. Cell Sci.* 107:3403-3412.
- Lewis AK, Bridgman PC (1992) Nerve growth cone lamellipodia contain two populations of actin filaments that differ in organization and polarity. *J. Cell Biol.* 119:1219-1243.
- Lewis SA, Ivanov IE, Lee G-H, Cowan NJ (1989) Organization of microtubules in dendrites and axons is determined by a short hydrophobic zipper in microtubule-associated proteins MAP2 and tau. *Nature* 342:498-505.
- Lewis SA, Wang D, Cowan NJ (1988) Microtubule-associated protein MAP2 shares a microtubule binding motif with tau protein. *Science* 239:936-939.
- Ludin B, Matus A (1993) The neuronal cytoskeleton and its role in axonal and dendritic plasticity. *Hippocampus* 3:61-72.
- Mandell J, Banker G (1996) Microtubule-associated proteins, phosphorylation gradients, and establishment of neuronal polarity. *Perspec. Dev. neurobiol.* 4:125-135.
- Neve RL, Harris P, Kosik KS, Kurnit DM, Donlon TA (1986) Identification of cDNA clones for the human microtubule-associated protein tau and chromosomal localization of the genes for tau and microtubule-associated protein 2. *Mol. Brain Res.* 1:271-280.
- Papandrikopoulou A, Doll T, Tucker RP, Garner CC, Matus A (1989) Embryonic MAP2 lacks the cross-linking sidearm sequences and dendritic targeting signal of adult MAP2. *Nature* 340:650-652.
- Pickering D, Thomsen C, Suzdak P, Fletcher E, Robitaille R, Salter M, MacDonald J, Huang X-P, Hampson D (1993) A comparison of two alternatively spliced forms of a metabotropic glutamate receptor coupled to phosphoinositide turnover. *J. Neurochem.* 61:85-92.
- Puius Y, Mahoney N, Almo S (1998) The modular structure of actin-regulatory proteins. *Curr. Op. Cell Biol.* 10:23-34.
- Reezek D, Bretscher A (1998) The carboxyl-terminal region of EBP50 binds to a site in the amino-terminal domain of ezrin that is masked in the dormant molecule. *J. Biol. Chem.* 273:18452-18458.
- Selden SC, Pollard TD (1983) Phosphorylation of microtubule-associated proteins regulates their interaction with actin filaments. *J. Biol. Chem.* 258:7064-7071.

- Sharma N, Kress Y, Shafit-Zagardo B (1994) Antisense MAP2 oligonucleotides induce changes in microtubule assembly and neuritic elongation in pre-existing neurites of rat cortical neurons. *Cell Motil. Cyto.* 27:234-247.
- SurrIDGE C, Burns R (1994) The difference in the binding of phosphatidylinositol distinguishes MAP2 from MAP2C and Tau. *Biochemistry* 33:8051-8057.
- Suter D, Forscher P (1998) An emerging link between cytoskeletal dynamics and cell adhesion molecules in growth cone guidance. *Curr. Opin. Neurobiol.* 8:106-116.
- Tanaka E, Sabry J (1995) Making the connection: Cytoskeletal rearrangements during growth cone guidance. *Cell* 83:171-176.
- Tucker R (1990) The role of microtubule-associated proteins in brain morphogenesis: a review. *Brain Res. Rev.* 15:101-120.
- Voter W, Erickson H (1982) Electron microscopy of MAP2 (Microtubule-associated protein 2). *J. Ultrastruct. Res.* 80:374-382.
- Wille H, Mandelkow E-M, Dingus J, Vallee R, Binder L, Mandelkow E (1992) Domain structure and antiparallel dimers of Microtubule-associated protein 2 (MAP2). *J. Struct. Biol.* 108:49-61.
- Woody R, Clark D, Roberts G, Martin S, Bayley P (1983) Molecular flexibility in microtubule proteins: proton nuclear magnetic resonance characterization. *Biochemistry* 22:2186-92.
- Yamauchi P, Purich D (1987) Modulation of microtubule assembly and stability by phosphatidylinositol action on microtubule-associated protein-2. *J. Biol. Chem.* 262:3369-3375.
- Yamauchi P, Purich D (1993) Microtubule-associated protein interactions with actin filaments: evidence for differential behavior of neuronal MAP-2 and tau in the presence of phosphatidyl-inositol. *Biochem. Biophys. Res. Comm.* 190:710-715.
- Yamauchi T, Fujisawa H (1983) Disassembly of microtubules by the actions of calmodulin-dependent protein kinase (kinase II) which occurs only in the brain tissues. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 110:287-291.
- Yamauchi T, 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.

Figure 1: *Illustration of the different mutated forms of MAP2 constructs expressed in Sf9 cells.*

The three open boxes represent the three repeat sequences of the microtubule binding domain. The highlighted sections indicate the highly conserved regions. The percentage of Sf9 cells with processes (induced by each MAP2 mutated form) is indicated to the right. All mutated forms induced more cells with processes than MAP2b did, except Prob and Proc which did not induce process formation.

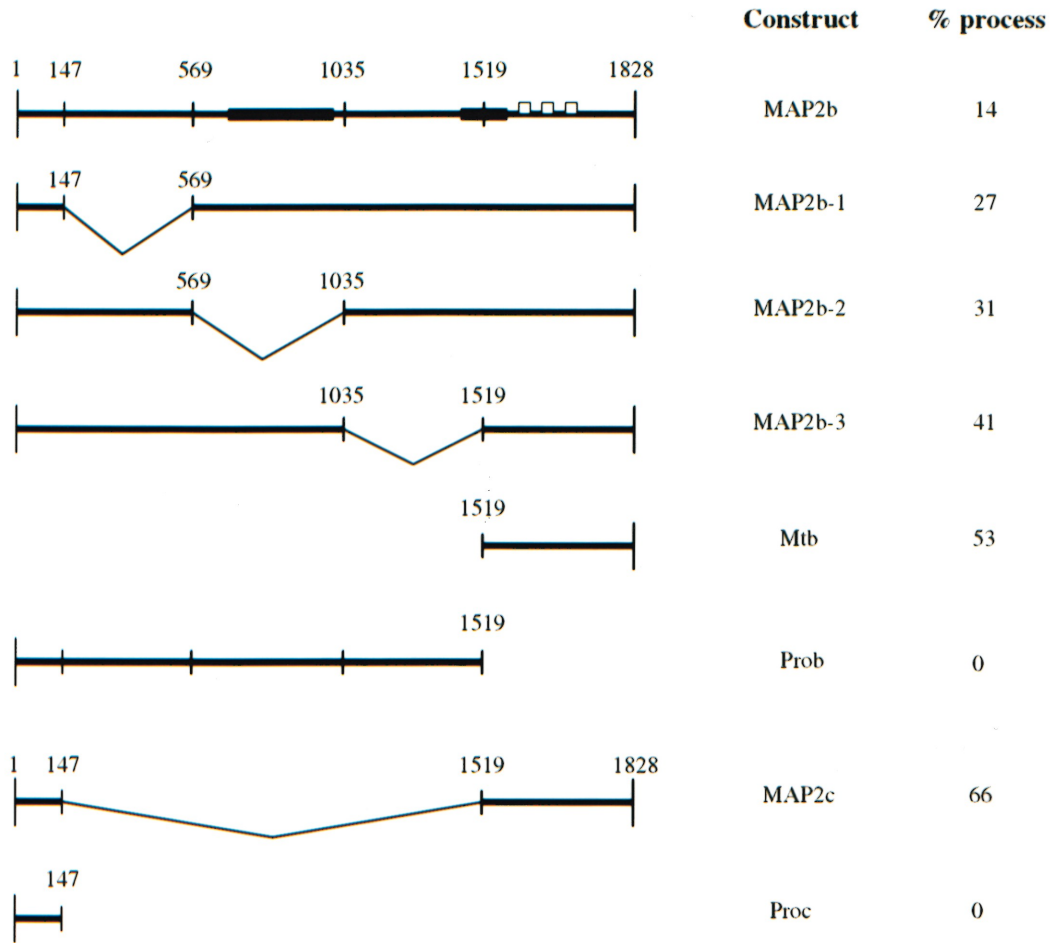


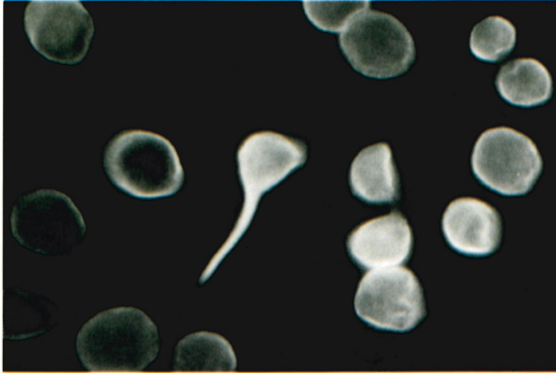
Figure 2: *Immunoblot of baculovirally expressed truncated forms of MAP2.*

The proteins were extracted at 72 hrs post-infection. The samples were run on a 7,5% SDS-Page and immunoblotted with the HM2 antibody except for Mt which was revealed with the 46.1 antibody. The molecular weight of MAP2b-1, MAP2b-2, MAP2b-3 and Prob is around 240kDa and that of MAP2b is 280kDa. The molecular weight of MAP2c, Mt and Proc is around 70kDa, 40kDa and 30kDa respectively. In lane 1, 2 and 7, the multiple bands are imputable to protein degradation that occasionally occurs during preparation of cell lysates.

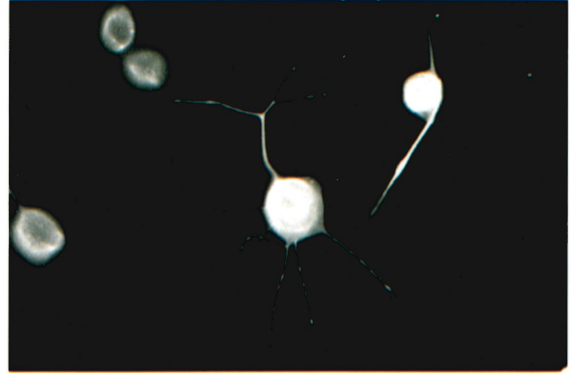
Figure 3: *Immunofluorescence micrographs illustrating the different patterns of process outgrowth induced by the expression of the truncated forms of MAP2 in Sf9 cells.*

All the truncated forms of MAP2 were revealed with HM2 antibody except for Mt which was revealed with 46.1 antibody. Each of the truncated forms is distributed in processes and cell body. MAP2c and Mt have a highest tendency to induce the formation of multiple processes whereas MAP2b, MAP2b-1, MAP2b-2 and MAP2b-3 induced the formation of a unique process. Prob and Proc did not induce process formation. The observations were done with fluorescence microscopy.

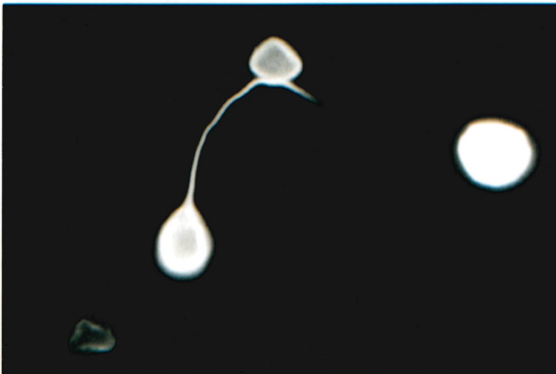
MAP2b



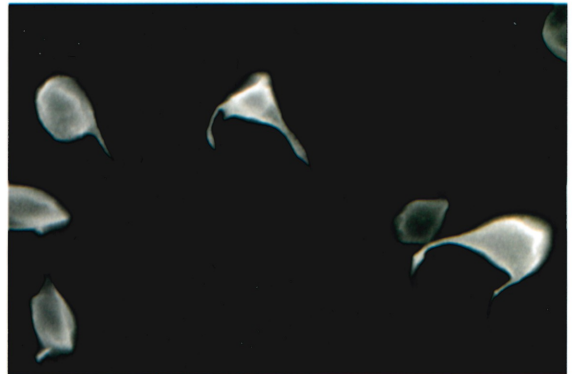
MAP2c



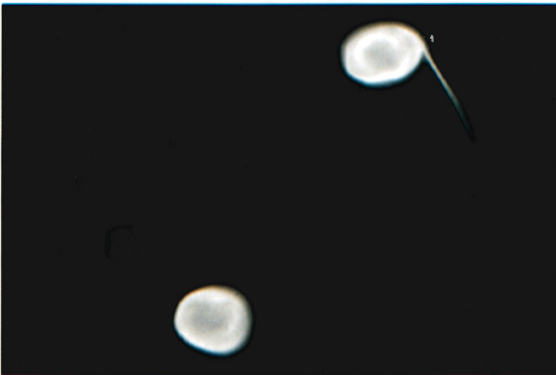
MAP2b-1



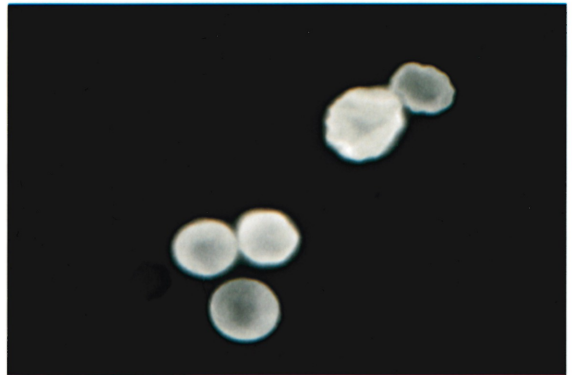
Mt



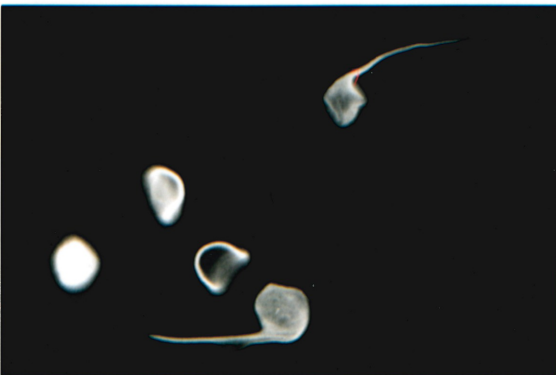
MAP2b-2



Prob



MAP2b-3



Proc

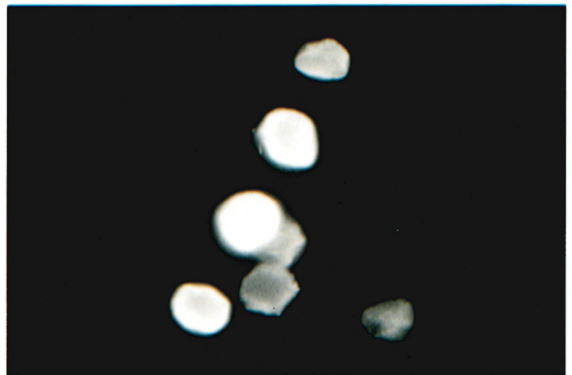


Figure 4: *Histogram illustrating the number of process per cell induced by the expression of truncated forms of MAP2.*

For each construct expressed in Sf9 cells, the number of cells with none, one, two or more than two processes was analysed. MAP2c and Mt induced the highest percentage of cells with multiple processes. MAP2b-1, MAP2b-2 and MAP2b-3 induced the formation of a unique process, MAP2b-3 inducing the highest percentage of cells with processes. Three sets of experiments were analyzed. 150 cells were measured for each set. Horizontal lines indicate the constructs that are statistically different (significance $p < 0,003$).

% of cells with process

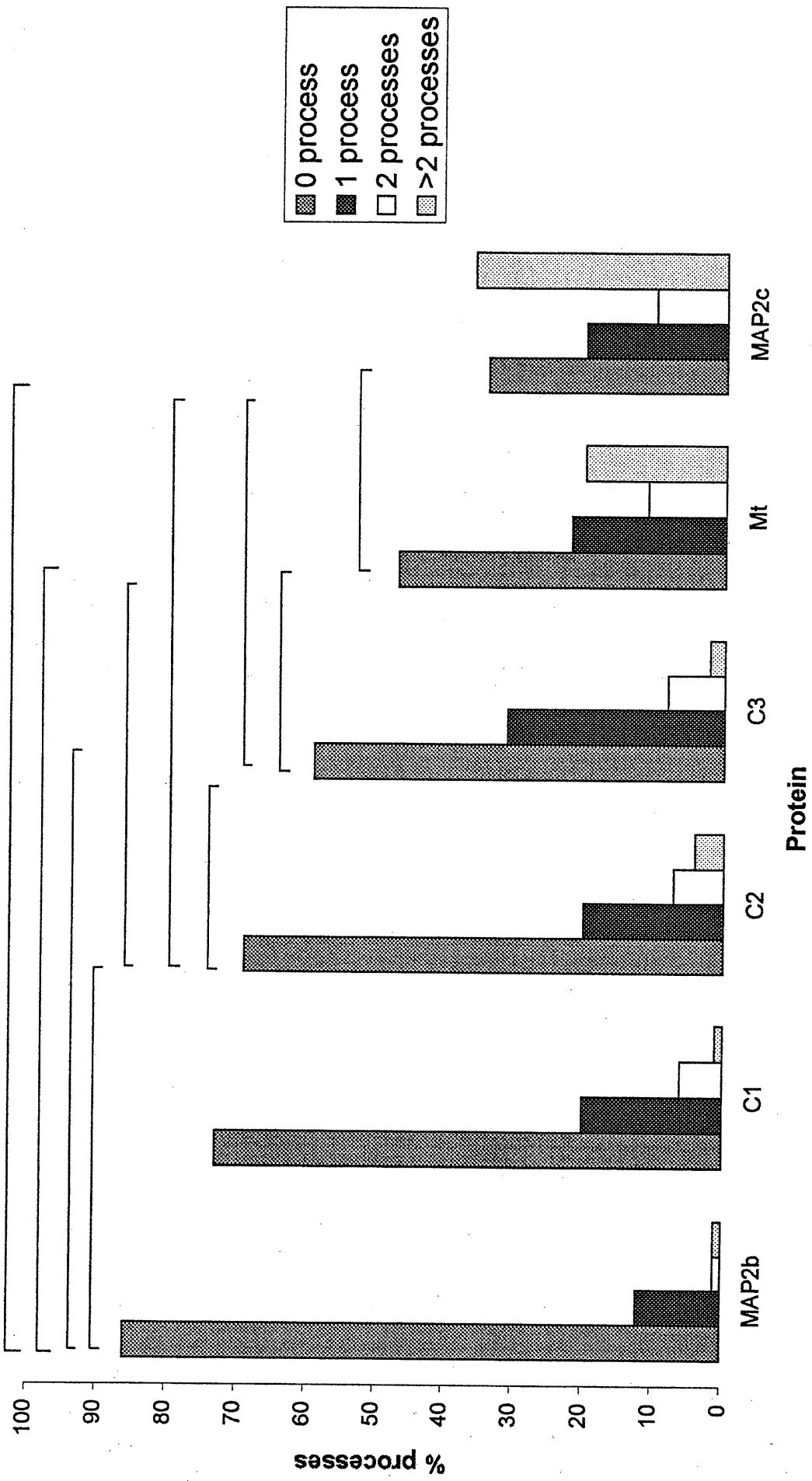


Figure 5: *Histogram illustrating the mean of the process length per cell induced by the expression of truncated forms of MAP2.*

MAP2b, MAP2c, Mt and MAP2b-2 induced the shortest processes whereas MAP2b-1 and MAP2b-3 induced the longest processes. Three sets of experiments were analyzed. To evaluate the length of process for each construct, 50 cells were used for each experiment. Horizontal lines indicate the constructs that are statistically different ($p < 0,05$).

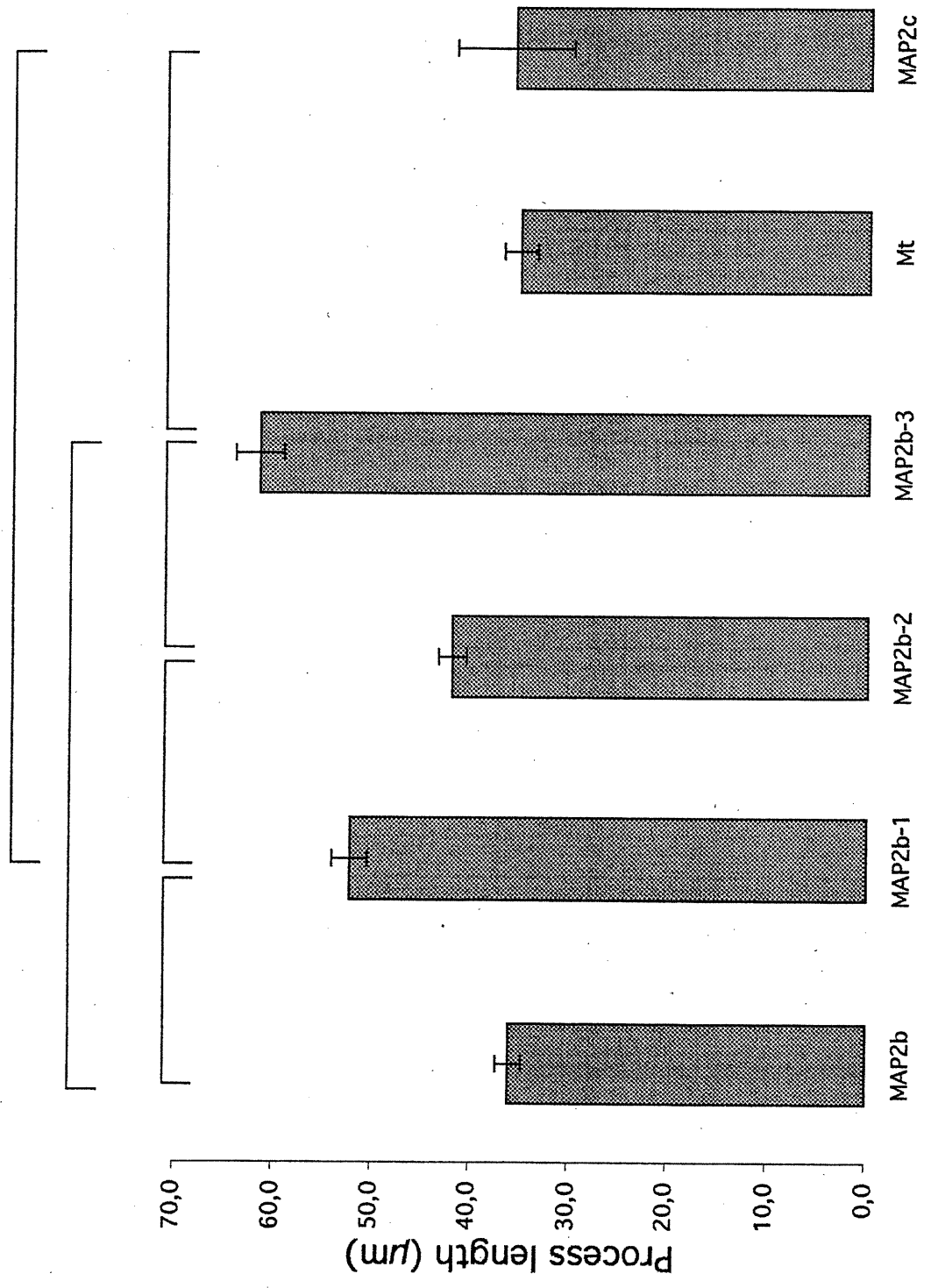
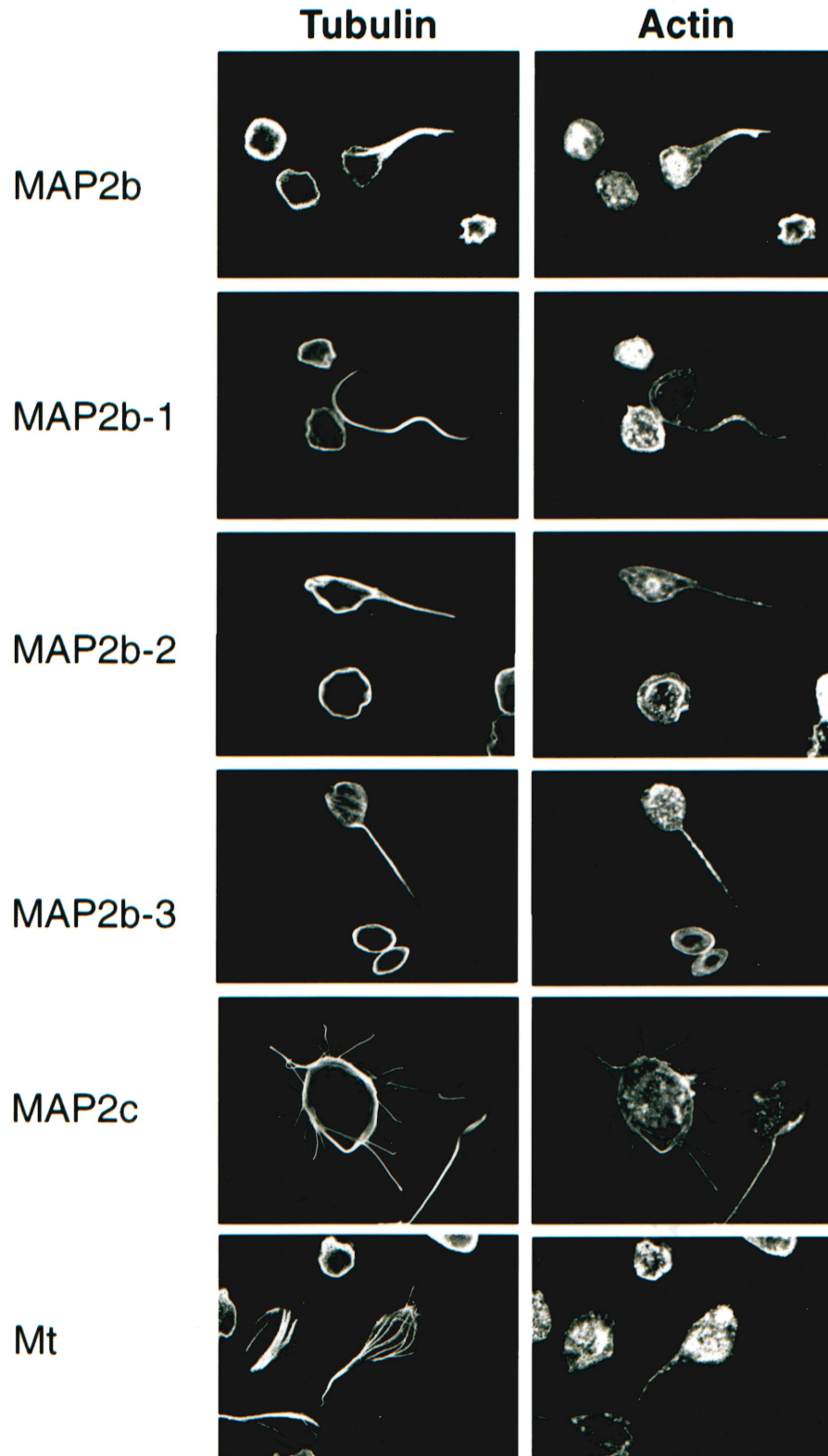


Figure 6: *Immunofluorescence micrographs illustrating the distribution of microtubules and F-actin in cells expressing the truncated forms of MAP2.*

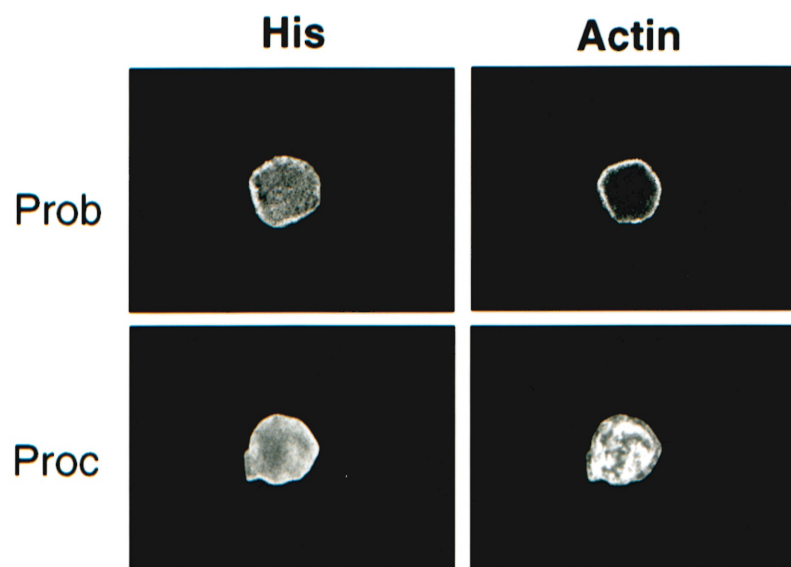
A) In MAP2c-expressing cells, microtubules irradiate from the cell surface to form processes and F-actin is mainly found at the sites of emergence of the processes. In MAP2b expressing cells presenting one process, microtubules form thin bundles in the cell body that join in the hillock region to form a thick bundle that elongate to form one process. F-actin is distributed in the cell body and in the process. In MAP2b-expressing cells that do not develop processes, microtubules form a ring under the plasma membrane. F-actin is found in the cytoplasm. In MAP2b-1, MAP2b-2 and MAP2b-3 expressing cells, the microtubules and F-actin have a distribution similar to the one observed in MAP2b expressing cells. In the Mt-expressing cells, the microtubules mostly form many bundles. In cells with processes, these bundles often join at one pole of the cell to form a thick bundle that elongate to generate one process. F-actin is distributed uniformly in the cell body and the process.

B) Here the cells were stained with an antibody that recognizes the His tag added in the N-terminal of all mutated forms of MAP2. The Prob and Proc-expressing cells show no microtubule formation (data not shown). Interestingly, F-actin forms a ring under the plasma membrane in Prob-expressing cells. This is not observed in Proc-expressing cells.

A



B



Chapitre troisième

Discussion générale

Discussion générale

L'une des étapes déterminantes, lors de la différenciation neuronale, est le développement des prolongements dendritiques et axonaux. Les éléments du cytosquelette jouent un rôle primordial au cours de cette étape (Mattson 1999). L'expression de MAP2 a été corrélée à la différenciation des dendrites et de l'axone. Une des fonctions de MAP2 serait de faire le lien entre les différentes composantes du cytosquelette. Les différentes isoformes de MAP2 sont composées de deux domaines : un domaine de liaison aux microtubules et un domaine de projection. Nous nous sommes intéressés aux deux isoformes de MAP2 les mieux caractérisées : MAP2b et MAP2c. MAP2b diffère de MAP2c par l'insertion d'une séquence de 1372 acides aminés dans le domaine de projection (Papandriopoulou et al. 1989). Dans la présente étude, nous avons voulu déterminer la fonction du domaine de projection dans l'élaboration de prolongements cytoplasmiques par une cellule. Nous avons donc construit six formes mutantes de MAP2b; chacune comportant une délétion plus ou moins étendue du domaine de projection de MAP2b. Nous avons ensuite exprimé ces formes mutantes de MAP2b dans la lignée cellulaire Sf9. Des études antérieures ont démontré que MAP2c et MAP2b induisent différents patterns de production de prolongements cytoplasmiques dans les cellules Sf9 (Leclerc et al 1996). MAP2b induit l'émergence de prolongements dans seulement 20% des cellules comparé à 60% pour MAP2c. De plus, les prolongements induits par l'expression de MAP2b sont uniques, courts et trapus alors que ceux induits par l'expression de MAP2c sont multiples et fins. Ces résultats indiquent que MAP2b a une capacité plus faible que MAP2c à induire la formation de prolongements cytoplasmiques. Nous avons donc exprimé dans les cellules Sf9 des formes mutantes de MAP2b qui contiennent des délétions dans la séquence de 1372 acides aminés (non incluse dans MAP2c) afin de déterminer la portion de cette dernière qui est responsable de la différence fonctionnelle entre MAP2b et MAP2c.

Nos résultats montrent que le domaine de projection n'est pas nécessaire à l'élaboration de prolongements dans les cellules Sf9 puisque l'expression du domaine de liaison aux

microtubules est suffisante pour produire des prolongements cytoplasmiques. Toutefois, la séquence comprise dans le domaine de projection de MAP2c semble favoriser l'émergence de même que l'élongation des prolongements puisque l'expression du domaine de liaison aux microtubules induit un plus faible pourcentage de cellules avec prolongements et un nombre plus petit de prolongements par cellule que MAP2c. Ces résultats nous indiquent donc que l'effet inhibiteur du domaine de projection de MAP2b sur la production de prolongements cytoplasmique est exercé par la séquence additionnelle de 1372 acides aminés.

Fonctions du domaine de projection de MAP2c

Il a été montré que l'expression de MAP2c dans les cellules Sf9 induit un plus grand nombre de cellules avec des prolongements ainsi qu'un plus grand nombre de prolongements par cellule que MAP2b (Leclerc et al. 1996). Nos résultats montrent que la délétion du domaine de projection de MAP2c résulte en une diminution modérée du nombre de cellules qui ont des prolongements mais une diminution importante du nombre de prolongements par cellule. Comme l'expression du domaine de projection de MAP2c dans les cellules Sf9 n'induit aucun réarrangement apparent du cytosquelette, l'une de ses fonctions pourrait être de réguler l'action du domaine de liaison aux microtubules sur le cytosquelette.

Interaction avec l'actine-F

Dans les cellules Sf9 qui expriment une isoforme de MAP2 ou les formes mutantes de MAP2b, les microtubules et les microfilaments d'actine ont une distribution particulière qui est reliée au nombre de prolongements par cellule (Boucher et al. 1999; Leclerc et al. 1996). Dans les cellules qui présentent plusieurs prolongements, les microtubules émergent du corps cellulaire de façon tangentielle. Dans les cellules qui présentent un seul prolongement, les microtubules forment des faisceaux dans le corps cellulaire qui se joignent à un pôle de la cellule pour former un prolongement. Dans les cellules qui n'ont pas de prolongement, les microtubules se rassemblent en un large faisceau (anneau) sous la membrane plasmique. Pour ce qui est de l'actine-F, elle se retrouve concentrée au site d'émergence des prolongements dans les cellules avec plusieurs

prolongements alors que dans les cellules avec un seul prolongement, elle est distribuée dans le cytoplasme du corps cellulaire et du prolongement. Dans les cellules qui n'ont pas de prolongements, l'actine-F se retrouve dans le cytoplasme et sous la membrane plasmique (Boucher et al. 1999). Cette distribution de l'actine-F est également observée dans les cellules qui ont été infectées avec le virus sauvage (Charlton et Volkman, 1991). Toutes les formes mutantes de MAP2b, à l'exception du domaine de projection de MAP2b (Prob) et de la séquence retrouvée dans le domaine de projection de MAP2c (Proc), induisent l'assemblage des microtubules et une redistribution de l'actine-F. Entre autres, le domaine de liaison aux microtubules promeut l'assemblage des microtubules et également une redistribution de l'actine-F dans les cellules Sf9. Ce domaine contient les trois séquences répétées responsables de l'assemblage des microtubules (Ludin et al. 1996; Kindler et al. 1990; Lewis et al. 1989). De plus, Correas et al. (1990) ont montré qu'un peptide correspondant à la deuxième séquence répétée du domaine de liaison aux microtubules se lie à l'actine-F. À la lumière de ces observations et de nos résultats, le domaine de liaison aux microtubules serait donc capable d'interagir avec les deux éléments du cytosquelette impliqués dans la formation de prolongements cytoplasmiques (Tanaka et Sabry 1995; Suter et Forscher, 1998).

La distribution des microtubules dans une cellule dépend de l'organisation de l'actine corticale. En effet, l'actine agit comme une barrière qui guide l'élongation des microtubules (Suter et Forscher 1998). Par exemple, lorsque l'actine est organisée en faisceaux (filaments reliés entre eux de façon parallèle), les microtubules sont incapables de pénétrer cette structure et par conséquent, ils forment un faisceau sous la membrane plasmique (ceci est observé dans la majorité des cellules Sf9 qui expriment MAP2b) (Boucher et al. 1996; Leclerc et al. 1996). Il peut y avoir dans l'actine corticale un site où les filaments d'actine sont moins bien organisés en faisceaux parallèles. Dans ce cas, les microtubules peuvent pénétrer cette région et s'allonger pour former un seul prolongement (ceci pourrait être le cas dans les cellules Sf9 qui expriment MAP2b et qui présentent un prolongement). Par contre, lorsque l'actine-F est organisée en un réseau isotropique (filaments liés entre eux avec un angle), les microtubules sont alors capables de pénétrer ce réseau d'actine et de s'allonger pour

former des prolongements. Il a été démontré que MAP2c est capable de former un réseau isotropique d'actine alors que MAP2b induit la formation de faisceaux d'actine (Cunnigham et al. 1997). Ceci pourrait expliquer le fait que MAP2c a une plus grande capacité que MAP2b à induire la formation de prolongements cytoplasmiques dans les cellules Sf9. Pour ce qui est du domaine de liaison aux microtubules, il induit un pourcentage identique de cellules avec un seul ou plusieurs prolongements. Ces résultats suggèrent que ce domaine pourrait induire soit la formation d'un réseau isotropique, soit la formation de faisceaux d'actine selon la concentration de la protéine. En effet, il a été démontré qu'à très forte concentration, MAP2c induit non pas la formation d'un réseau d'actine mais plutôt la formation de faisceaux d'actine (Cunnigham et al. 1997). Le fait que MAP2c induise un plus grand nombre de cellules avec plusieurs prolongements que le domaine de liaison aux microtubules suggère que le domaine de projection de MAP2c pourrait favoriser la formation d'un gel isotropique d'actine-F. Pour qu'une protéine puisse inter-relier les microfilaments d'actine, elle doit avoir au moins deux sites de liaison à l'actine ou encore avoir un seul site de liaison à l'actine mais avoir la possibilité de dimériser (Puius et al. 1998; McGough et al. 1998). Dans les isoformes de MAP2, un seul site de liaison à l'actine a été identifié dans le domaine de liaison aux microtubules (Correas et al. 1990). De plus, des expériences de co-immunoprécipitation et de co-sédimentation effectuées dans notre laboratoire suggèrent que le domaine de projection de MAP2c ne se lie pas à l'actine-F. Ces résultats nous indiquent que MAP2c doit dimériser pour former un gel d'actine-F. Il a été démontré que le domaine de liaison aux microtubules est capable de former des dimères et ainsi pourrait inter-relier les filaments d'actine (Wille et al. 1992). Néanmoins, le domaine de projection pourrait favoriser la formation d'un gel isotropique plutôt que la formation de faisceaux en induisant un angle entre les filaments d'actine.

Une autre fonction possible du domaine de projection de MAP2c pourrait être de favoriser l'interaction entre les microtubules et les microfilaments d'actine. En effet, comme mentionné auparavant, dans les cellules qui développent plusieurs prolongements, il y a une co-localisation des microtubules et de l'actine-F aux sites

d'émergence des prolongements (Boucher et al. 1999). Ceci suggère qu'il y a une interaction entre ces deux éléments du cytosquelette dans ces régions. Le domaine de projection pourrait donc favoriser une interaction entre les microtubules et l'actine-F et ainsi les coordonner pour induire la formation de prolongements multiples.

Le domaine de projection de MAP2c pourrait également augmenter l'affinité de MAP2c pour les microfilaments d'actine en imposant une conformation qui favoriserait la liaison de MAP2c à l'actine-F. Des études antérieures ont démontré que MAP2 liée aux microfilaments d'actine peut lier les microtubules mais que MAP2 liée aux microtubules a une affinité plus faible pour les microfilaments d'actine (Cunningham et al. 1997). Le domaine de liaison aux microtubules pourrait avoir une affinité moins grande pour les microfilaments d'actine et ainsi lier surtout les microtubules. Cette liaison aux microtubules pourrait ainsi diminuer davantage son affinité pour l'actine-F.

Implication dans les voies de signalisation

En 1999, Boucher et al. ont montré que la capacité de MAP2c à induire la formation de prolongements multiples est reliée à son état de phosphorylation. Des sites de phosphorylation dans le domaine de projection de MAP2c pourraient influencer l'interaction du domaine de liaison aux microtubules avec les éléments du cytosquelette et ainsi modifier le pattern de production de prolongements cytoplasmiques.

Le domaine de projection de MAP2c pourrait également être impliqué dans des voies de signalisation propres aux neurones. MAP2 et Tau présentent 80% d'homologie dans le domaine de liaison aux microtubules et aucune homologie dans le domaine de projection (Lewis et Cowan 1988). Lorsque le domaine de liaison aux microtubules de Tau est exprimé dans une lignée cellulaire neuronale, il n'induit pas la formation de prolongements. Le domaine de projection de Tau est donc nécessaire à la formation de neurites. En effet, il a été montré que le domaine de projection de Tau interagit avec la membrane cellulaire et qu'il n'y a plus de formation de neurites si on empêche cette interaction (Brandt et al. 1995). Le domaine de projection de MAP2 a peut-être une fonction similaire au domaine de projection de Tau dans les neurones.

Fonctions de la séquence de 1372 acides aminés du domaine de projection de MAP2b

Interaction avec l'actine-F

Nos résultats suggèrent que le domaine de projection de MAP2c semble réguler le nombre de prolongements par cellule. Toutefois, l'insertion de la séquence de 1372 acides aminés affecte cette régulation puisque l'expression de MAP2b induit la formation de prolongements dans un très faible pourcentage de cellules. L'une des différences fonctionnelles connue entre MAP2b et MAP2c est qu'elles organisent de façon distincte l'actine-F. Comme cela a été mentionné auparavant, il a été montré que MAP2c induit la formation d'un gel isotropique d'actine alors que MAP2b induit la formation de faisceaux d'actine-F (Cunningham et al. 1997). Des expériences d'immunoprécipitation et de co-sédimentation sont présentement en cours dans notre laboratoire pour mieux comprendre l'interaction de MAP2b et MAP2c avec les microfilaments d'actine. Jusqu'à maintenant, nos résultats montrent que MAP2c co-immunoprécipite avec l'actine mais pas MAP2b. Cela ne signifie pas que MAP2b n'interagit pas avec les microfilaments d'actine mais cela pourrait indiquer que l'interaction de MAP2b avec l'actine est beaucoup plus faible que celle de MAP2c. Ceci montre que la séquence additionnelle de 1372 acides aminés pourrait modifier l'affinité de MAP2b à se lier à l'actine. D'ailleurs, MAP2b induit la formation de faisceaux d'actine à très haute concentration seulement (au delà de 1 μ M) (Cunningham et al. 1997).

Lorsque le domaine de projection de MAP2b est exprimé dans les cellules Sf9, on observe que l'actine-F s'organise en anneau sous la membrane plasmique et que le domaine de projection (Prob) est concentré dans cette région (figure 6). Ceci indique que le domaine de projection de MAP2b pourrait interagir avec l'actine-F via un site de liaison à l'actine compris dans la séquence de 1372 acides aminés. Une autre possibilité est que la séquence de 1372 acides aminés pourrait réguler l'interaction de MAP2b avec une protéine de liaison à l'actine. Ceci pourrait stabiliser le cytosquelette d'actine. En effet, il a été montré que MAP2b stabilise l'actine-F dans les cellules Sf9 (Boucher et al. 1999). MAP2b pourrait ainsi être un intégrateur du cytosquelette qui stabilise les

différents éléments du cytosquelette comme cela est le cas pour BPAG1 (Dalpé et al. 1998; Yang et al. 1999).

Interaction dans les voies de signalisation

Le domaine de projection s'étend à la surface du microtubule et peut ainsi interagir avec d'autres éléments qui régulent la production des prolongements. La séquence de 1372 acides aminés pourrait interagir avec des protéines de signalisation et ainsi modifier l'interaction de MAP2b avec les éléments du cytosquelette. En effet, plusieurs kinases (exemple :cAMP kinase, CAM kinase, PKA) interagissent avec MAP2 (Goldenring et al. 1985; Silliman et Sturgill 1989; Itoh et al. 1997; Sontag et al. 1995; Morishima et al. 1996). Il est également connu que différents états de phosphorylation de MAP2 modifient son interaction avec le cytosquelette. Par exemple, la phosphorylation de MAP2b par la CAM kinase inhibe sa capacité d'assembler les microtubules (Hoshi et al. 1992; Goldenring et al. 1985). La phosphorylation de MAP2b par la cAMP kinase diminue également sa capacité d'inter-relier les microfilaments d'actine. La partie médiane (569e au 1035e acide aminé) de la séquence de 1372 acides aminés comprend une région (650e au 930e acide aminé) hautement conservée (Kindler et al. 1990). Cette région contient plusieurs séquences consensus pouvant être phosphorylées par la cAMP kinase et la CAM kinase (Hernandez et al. 1987; Friedrich et Aszodi 1991; Kindler et al. 1990). Il a d'ailleurs été montré que cette région de MAP2b est phosphorylée *in vitro* (Burns et Islam 1984; Hernandez et al. 1987). Plusieurs sites de phosphorylation de cAMP kinases et CAM kinases ont été éliminés dans la forme mutante MAP2b-2. D'ailleurs, cette forme mutante induit un plus grand nombre de cellules avec prolongements que MAP2b.

Conformation structurale des formes opérationnelles et non-opérationnelles de MAP2b

Dans les cellules Sf9, MAP2b a une capacité plus faible que MAP2c à induire la croissance de prolongements. Toutefois, une délétion complète ou partielle du domaine de projection augmente la capacité de MAP2b à induire la formation de prolongements. Ces résultats suggèrent que la séquence de 1372 acides aminés pourrait imposer à MAP2b une conformation structurale. Cette conformation pourrait, par encombrement stérique et/ou interaction intra-moléculaire, masquer des domaines qui régulent l'activité de MAP2b. Des études de « rotary shadowing » et de microscopie électronique suggèrent que le domaine de projection de MAP2b forme un long bâtonnet semi-rigide (Hirokawa, 1982; Voter et Erickson 1982). Il a toutefois été montré que ce bâtonnet est flexible (Woody et al. 1983; Kindler et al. 1990). De plus, des analyses de la structure primaire de MAP2b ont suggéré que le domaine de projection de cette protéine contient plusieurs séries d'hélices alpha séparées par de petites boucles (Kindler et al. 1990). Cette structure secondaire pourrait contribuer à la flexibilité du domaine de projection. Il a été montré pour la protéine Tau que sa flexibilité diminue considérablement lorsqu'elle est liée aux microtubules. Cela n'est pas le cas de MAP2b. La phosphorylation diminue également la flexibilité de Tau (Hagestedt et al. 1989). Ceci n'a pas été démontré pour MAP2b. Toutefois, comme le domaine de projection de MAP2b contient plusieurs sites de phosphorylation, il est possible que la phosphorylation affecte la flexibilité de MAP2b. Plusieurs évidences suggèrent que la longueur du domaine de projection de MAP2b peut varier. Des résultats obtenus en « rotary shadowing » par Voter et Erickson (1982) suggèrent que le domaine de projection se replierait sur lui-même. De plus, il a été montré que la longueur du domaine de liaison aux microtubules représente la moitié de la longueur totale de MAP2b; en dépit du fait que ce domaine comprend le 1/6e de la masse totale de MAP2b (Wille et al. 1992). Des variations de l'état de phosphorylation de MAP2b pourraient permettre une variation du degré d'extension du domaine de projection ; ce qui résulterait en un masquage ou exposition de sites impliqués dans l'interaction de kinases, phosphatases ou autres molécules de signalisation qui régulent l'activité de

MAP2b lors de la différenciation neuronale. De manière similaire, des domaines de MAP2b qui interagissent avec le cytosquelette pourraient également être masqués ou exposés par différents états de phosphorylation. Les états de phosphorylation de MAP2b varient lors de la différenciation neuronale. Ainsi, la phosphorylation pourrait réguler la configuration structurale du domaine de projection de MAP2b durant la différenciation neuronale.

Des études en microscopie électronique proposent que MAP2b peut former une structure en épingle à cheveux (Wille et al. 1992; Burns et al. 1984). De plus, en étudiant la stœchiométrie de MAP2:tubuline et MAP2:phosphorylation, il a été montré que 12 sites de phosphorylation de MAP2b sont retrouvés dans la portion de MAP2b qui est liée à la tubuline; malgré le fait que seulement 10 sites de phosphorylation ont été trouvés dans le domaine de liaison aux microtubules. Sachant que deux autres sites de phosphorylation sont localisés sur le domaine de projection, il semble donc que MAP2b peut se replier sur elle-même dans la région située entre ces sites de phosphorylation (Burns et al 1984). Le repliement du domaine de projection pourrait avoir un effet stabilisateur sur l'association du domaine de liaison aux microtubules avec les microtubules. Ce repliement pourrait également masquer des domaines fonctionnels situés dans le domaine de liaison aux microtubules qui seraient impliqués dans la formation de prolongements cytoplasmiques. Cela pourrait expliquer le fait que MAP2b est moins efficace que MAP2c à induire la formation de prolongements dans les cellules Sf9. Les formes mutantes MAP2b-1, MAP2b-2 et MAP2b-3 induisent un plus grand nombre de cellules avec prolongements que MAP2b dans les cellules Sf9. Cela pourrait être expliqué par le fait que les régions délétées sont impliquées dans le masquage de domaines fonctionnels situés dans le domaine de liaison aux microtubules qui sont impliqués dans la production de prolongements cytoplasmiques. Cette situation a été rapportée pour ezrine; un membre de la famille des protéines ERM, qui lie le cytosquelette d'actine à la membrane. Il a en effet été montré qu'ezrine existe sous une forme «dormante» dans laquelle son site de liaison à l'actine (situé dans le C-terminal) est masqué par la portion N-terminale (Reczek et Bretsher 1998; Martin et al. 1995).

Le lieu d'épissage de MAP2c (147e acide aminé), situé de chaque côté de la séquence de 1372 acides aminés, est compris dans une région riche en prolines. Cette région pourrait agir comme une charnière qui régulerait la position du domaine de projection à la surface du domaine de liaison aux microtubules (figure III-1). La forme mutante MAP2b-1 est déléetée de la région comprise entre les 147e et 569e acides aminés; une séquence qui contient plusieurs prolines près du lieu d'épissage de MAP2c (147em acide aminé). Cette région pourrait réguler la position de la partie du domaine de projection commun à MAP2b et MAP2c en favorisant son extension ou son repliement. La dernière position pourrait favoriser des interactions intramoléculaires qui masqueraient des sites de liaison responsables de l'interaction de MAP2b avec le cytosquelette ou avec des protéines de signalisation. Par exemple, le repliement de la partie N-terminale d'eitrine masque son site de liaison pour EBP50 (ezrin-radixin-moesin-binding phosphoprotein 50)(Reczek et Bretsher 1998). Dans la forme mutante MAP2b-1, un coté de la charnière serait éliminé. En accord avec notre modèle, il est possible qu'en enlevant un des deux côtés de la charnière, le repliement d'une partie du domaine de projection sur le domaine de liaison aux microtubules soit considérablement réduit. Conséquemment, des sites du domaine de liaison aux microtubules impliqués dans la production de prolongements seraient exposés. L'expression de cette forme mutante résulte en un plus grand nombre de cellules Sf9 avec prolongements comparé à MAP2b. La forme mutante MAP2b-3, ayant une délétion de la séquence comprise entre les 1035e et 1519e acides aminés, est celle qui a la plus grande capacité à induire la formation de prolongement dans les cellules Sf9. Cette séquence contient une région riche en prolines qui s'étend du 1370e au 1650e acide aminé et de nombreux sites de phosphorylation pour les cAMP-dépendent kinases (Kindler et al. 1990). Le lieu d'épissage de MAP2c (1519e acide aminé) est inclus dans cette région riche en prolines. Cette région pourrait agir comme une charnière qui régulerait la position du domaine de projection de MAP2b à la surface des microtubules. Il est possible qu'en enlevant un des deux côtés de la charnière, l'angle formé par le repliement du domaine de projection sur le domaine de liaison aux microtubules soit aboli. Par conséquent, cette délétion éliminerait l'encombrement stérique formé par le domaine de projection sur les domaines fonctionnels du domaine de liaison aux

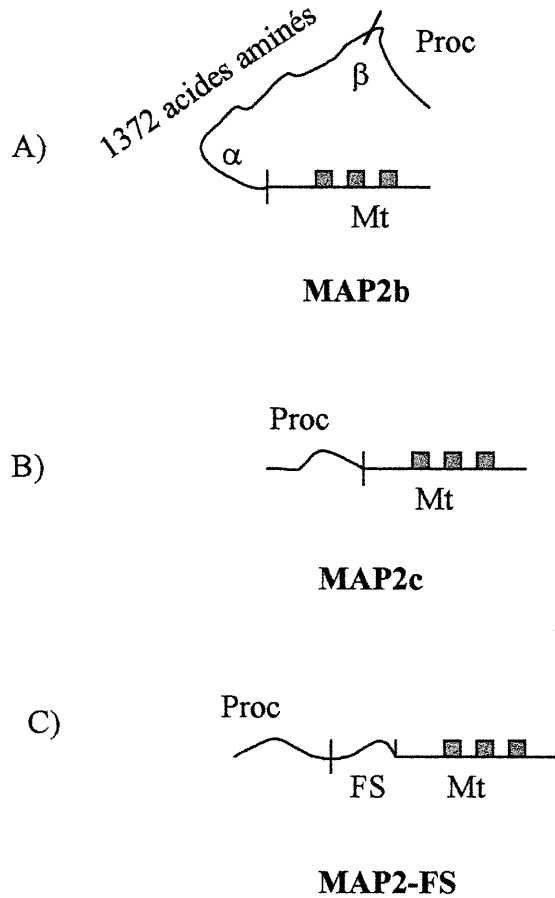


Figure III-1: Schéma illustrant les structures tertiaires que pourraient adopter MAP2b, MAP2c et les formes mutantes de MAP2

A) Le domaine de liaison aux microtubules (Mt) serait linéaire jusqu'à la jonction du domaine de projection de MAP2b où un angle α imposerait un repliement. Un autre angle β favoriserait un repliement de Proc sur Mt.

B) MAP2c aurait peu ou pas de structure tertiaire. Proc et Mt seraient linéaires.

C) Le fragment FS ajouté à MAP2c pourrait rendre Proc plus flexible. Cela pourrait permettre à MAP2-FS d'organiser les microfilaments d'actine et les microtubules de manière différente de MAP2c. Les cellules exprimant cette forme mutante de MAP2 ont 50% moins de prolongements multiples. La jonction de Proc et Mt semble donc importante dans MAP2c.

microtubules. Cela se traduirait par un plus grand nombre de cellules avec prolongements. Dans les formes mutantes MAP2b-1 et MAP2b-2, la région charnière entre les domaines de projection et de liaison aux microtubules est toujours présente mais étant donné que le domaine de projection est raccourci, l'encombrement stérique pourrait être légèrement diminué. Par conséquent, les sites impliqués dans la production de prolongements seraient partiellement exposés. Dans ce cas, une augmentation modérée du nombre de cellules avec prolongements serait alors observée. La région riche en prolines située en 5' du domaine de liaison aux microtubules de la protéine Tau augmente l'assemblage des microtubules en permettant probablement des interactions intramoléculaires (Goode et al. 1997). Cette région pourrait avoir une fonction similaire dans les isoformes de MAP2.

Aucune des délétions pratiquées à l'intérieur de la séquence de 1372 acides aminés n'a induit la formation de prolongements multiples comme le fait MAP2c. L'expression d'une forme tronquée de MAP2b, FS, qui comprend une délétion du 228e au 1621e acide aminé, induit deux fois moins de cellules avec prolongements multiples que MAP2c (figure III-1) (Leclerc et al., 1993). Ainsi, la formation de prolongements multiples par une cellule semble dépendre davantage de la région située au lieu d'épissage de MAP2c que d'un repliement du domaine de projection. La structure de MAP2c a été étudiée et il a été conclu qu'elle forme une structure colinéaire dont les parties N- et C-terminales sont à des extrémités opposées. De plus, des analyses par ordinateur de la séquence primaire de MAP2c suggèrent qu'elle a peu de structures secondaires (Wille et al. 1992b). MAP2c est considérablement plus petite (48nm) que ce qui avait été prédit par l'analyse de sa séquence primaire (177nm) (Wille et al. 1992b). Sachant que le domaine de liaison aux microtubules fait environ 49nm, cela suggère que la plus grande partie de la protéine interagit avec les microtubules. Il a été montré que MAP2c forme des structures en épingle à cheveux (Wille et al. 1992b). Dans cette configuration, MAP2c pourrait avoir une structure qui permettrait au domaine de projection de se replier et créer ainsi un domaine fonctionnel au lieu d'épissage de MAP2c. Ce domaine pourrait être impliqué dans la production de prolongements multiples par les cellules Sf9. Lorsque la séquence de 1372 acides

aminés est présente, ce domaine se trouverait désassemblé; ce qui empêcherait la formation de prolongements multiples par une cellule.

Nos résultats suggèrent donc que l'addition de 1372 acides aminés dans le domaine de projection permet à MAP2b d'exister sous une forme opérationnelle capable d'induire la formation de prolongements, ou non-opérationnelle qui est incapable d'induire la formation de prolongement. Dans la forme non-opérationnelle, le domaine de projection se replierait sur le domaine de liaison aux microtubules ce qui masquerait des domaines fonctionnels impliqués dans la formation de prolongements. Le repliement du domaine de projection serait régulé par deux régions riches en prolines situées de chaque côté de la séquence de 1372 acides aminés. Enfin, la formation de prolongements multiples par une cellule dépendrait d'une région située au lieu d'épissage de MAP2c.

Rôles distincts de MAP2b et MAP2c dans la différenciation neuronale

La présente étude suggère fortement que MAP2c joue un rôle important dans la formation de neurites au cours des premiers stades de différenciation neuronale. À l'opposé, MAP2b présente une capacité beaucoup moins grande que MAP2c à induire la formation de prolongements. Cependant, une délétion complète ou partielle de son domaine de projection augmente sa capacité à induire la formation de prolongements. Ce qui laisse croire que MAP2b contient les domaines fonctionnels pour induire la formation de prolongements. La fonctionnalité de ces domaines serait régulée par le domaine de projection. Ainsi, MAP2b existerait sous une forme opérationnelle, qui permettrait la formation de prolongements, ou sous une forme non-opérationnelle qui ne permettrait pas la formation de prolongements. Sous cette dernière forme, MAP2b exercerait un effet stabilisateur sur le cytosquelette ce qui contribuerait à maintenir la morphologie des dendrites des neurones adultes. Le changement d'une forme non-opérationnelle à une forme opérationnelle de MAP2b pourrait être régulé par ses états de phosphorylation. D'ailleurs, des changements de phosphorylation de MAP2b ont été corrélés avec des changements des dendrites (Halpain et Greengard 1990).

Il a également été démontré que MAP2b est dégradée au cours de changements morphologiques dans le cerveau adulte. En effet, une étude récente montre que le taux de produits de dégradation de MAP2b augmente dans les cerveaux de rats en situation d'apprentissage. Toutefois, le niveau de MAP2b demeure constant. Ceci indique que MAP2b est synthétisée au même rythme qu'elle est dégradée (Wille et al. 1992). Il est bien connu qu'il y a remodelage synaptique durant l'apprentissage. Ce remodelage synaptique implique la formation et l'élimination de prolongements. Cela se fait grâce à une réorganisation du cytosquelette. La dégradation de MAP2b est sans doute liée à la dépolymérisation des microtubules dans les portions de prolongement à éliminer et la synthèse de MAP2b à l'assemblage et la stabilisation des microtubules dans les nouveaux prolongements. Toutefois, les produits de dégradation de MAP2b pourraient tenir un certain rôle dans la formation de nouveaux prolongements. L'expression du domaine de liaison aux microtubules dans les cellules Sf9 montre que ce domaine est capable d'organiser les éléments du cytosquelette de manière à ce qu'il y ait initiation et formation de prolongements. Les produits de dégradation de MAP2b trouvés dans les cerveaux de rats en situation d'apprentissage comprennent peut-être le domaine de liaison aux microtubules. En effet, à la jonction des domaines de liaison aux microtubules et de projection, il y a plusieurs séquences reconnues par des protéases (séquences PEST). Les séquences PEST sont en fait des régions de huit résidus ou plus, riches en proline, glutamine, asparagine, sérine et thréonine. La production d'un fragment tronqué de MAP2b qui correspond au domaine de liaison aux microtubules pourrait participer à l'initiation des nouveaux prolongements.

Conclusion et perspectives d'avenir

Notre étude montre que le domaine de liaison aux microtubules possède toutes les propriétés nécessaires pour induire la formation de prolongements dans les cellules Sf9. Le domaine de projection exercerait plutôt un effet régulateur sur la capacité qu'a le domaine de liaison aux microtubules à initier la formation de prolongements. Notre modèle propose que le domaine de projection de MAP2b se replie et vient masquer des domaines fonctionnels du domaine de liaison aux microtubules nécessaires à la

formation de prolongements dans les cellules Sf9. Notre modèle propose également que la région située au lieu d'épissage de MAP2c est importante pour la formation de prolongements multiples par les cellules Sf9.

L'expression des diverses formes mutantes de MAP2b produite ici dans des neurones pourrait permettre d'étudier plus en détail l'effet des voies de signalisation sur la protéine MAP2b. Une étude, présentement en cours dans notre laboratoire, porte sur l'expression des formes mutantes de MAP2b dans un système neuronal (cellules P19). Par un effet dominant négatif nous espérons perturber la fonction de la protéine MAP2b endogène. En effet, la surexpression d'une forme mutante de MAP2b dans les cellules P19 empêcherait la protéine MAP2b endogène d'interagir avec les éléments du cytosquelette : la protéine mutante étant en surnombre. Cela nous permettrait d'observer les effets de l'expression d'une forme mutante dans un neurone. Cette étude permettra de vérifier si les domaines de MAP2b identifiés dans les cellules Sf9 sont effectivement impliqués dans la formation de prolongements dans le neurone.

Nos résultats, appuyés de certaines études, suggèrent que MAP2b aurait un rôle dans la sortie du cycle cellulaire d'un neurone. En effet, plusieurs cellules exprimant le domaine de liaison aux microtubules ont une forme ovale. Elles contiennent des faisceaux de microtubules qui s'étendent d'un pôle à l'autre de la cellule. Ces cellules ressemblent à des cellules en métaphase ou anaphase (voir figure II-13). Aucune cellule exprimant une autre forme mutante de MAP2 présente ce phénotype. Si les cellules qui expriment le domaine de liaison aux microtubules sont bien en mitose, il se pourrait par conséquent que le domaine de projection de MAP2 empêche les microtubules de s'organiser en fuseau. Ce qui préviendrait la migration des microtubules et maintiendrait la cellule en interphase. En 1991, Dinsmore et Solomon ont suggéré que MAP2 pourrait être nécessaire au passage de l'état mitotique à celui de post-mitotique des neurones. En effet, en supprimant l'expression de MAP2 dans les cellules P19 différenciées (avec des ARN antisens) ils ont noté que les cellules continuent de se diviser au même rythme que lorsqu'elles ne sont pas différenciées. Par l'expression de

formes tronqués de MAP2 dans une ligné neuronale, nous espérons déterminer le(s) domaine(s) de MAP2b impliqué(s) dans la sortie du cycle cellulaire par un neurone.

Bibliographie

Arnold S.E., Lee V.M-Y., Gur R.E. and Trojanowski J.Q. (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.

Audesirk G., Cabell L. and Kern M. (1997) Modulation of neurite branching by protein phosphorylation in cultured rat hippocampal neurons. *Developmental Brain Research.* 102:247-260.

Bangburg J.R and Bernstein B.W. (1991) Actin and actin binding proteins in neurons. In: *The Neuronal Cytoskeleton* (Burgoyne RD, ed.) pp121-160 New-York: Wiley-Liss.

Brandt R. Léger J. and Lee G. (1995) Interaction of Tau with the neural plasma membrane mediated by Tau's amino-terminal projection domain. (*The Journal of Cell Biology.* 131; 5: 1327-1340.

Brugg B. and Matus A. (1991) Phosphorylation determines the binding of microtubule-associated protein 2 (MAP2) to microtubule in living cells. *The Journal of Cell Biology.* 114.4:735-743.

Burns R.G. and Islam K. (1984) Stoichiometry of microtubule-associated-protein (MAP2) tubulin and the localisation of the phosphorylation and the cysteine residues along the MAP2 primary sequence; *European Journal of Biochemistry.* 141: 599-608.

Caceres A., Mautino J. and Kosik K.S. (1992) Suppression of MAP2 in cultured cerebellar macroneurons inhibits minor neurite formation. *Neuron.* 9:607-618.

Charlton CA, Volkman LE (1991) Sequential rearrangement and nuclear polymerization of actin in baculovirus-infected *Spodoptera frugiperda* cells. *Journal of Virology.* 65: 1219-1227.

Cheley S., Kosik K.S., Paskevich P., Bakalis S., Bayley H. (1992) Phosphorylated baculovirus p10 is a heat-stable-associated protein associated with process formation in Sf9 cells. *Journal of Cell Science*. 102: 739-752.

Chen J., Kanai Y., Cowan N.J., Hirokawa N. (1992) Projection domain of MAP2 and Tau determine spacings between microtubules in dendrites and axons. *Nature*. 360:674-677.

Chung W.J., Kindler S., Seidenbecher C. and Garner C.C. (1996) MAP2a, an alternatively spliced variant of microtubule-associated protein 2. *Journal of Neurochemistry*. 66:1273-1281.

Correas I., Padillas R. and Avila J. (1990) The tubulin binding sequence of brain microtubule associated proteins Tau and MAP2 is also involved in actin binding. *Biochem. J*. 269:61-64.

Cotter D., Kerwin R., Doshi B., Martin C-S and Everall I.P. (1997) Alteration in hippocampal non-phosphorylated MAP2 protein expression in schizophrenia. *Brain research*. 765:238-246.

Cravchik A., Reddy D. and Matus (1994) Identification of a novel microtubule-binding domain in microtubule-associated protein 1a (MAP1a). *Journal of Cell Science*. 107:3; 661-662.

Cunningham C.C., Leclerc N., Flanagan L.A., Lu M., Janmey P.A. and Kosik K.S. (1997) Microtubule-associated protein 2c reorganizes both microtubules and microfilaments into distinct cytological structures in an actin-binding protein-280-deficient Melanoma cell line. *The Journal of Cell Biology*. 136.4:845-857.

Dalpe G., Leclerc N., Vallée A., Messer A., Mathieu M., De Repentigny Y. and Kothary R. (1998) Dystonin is essential for maintaining neuronal cytoskeleton organization. *Molecular and Cellular Neuroscience*. 10:243-257.

Dinsmore J.H. and Solomon F. (1991) Inhibition of MAP2 expression affect both morphological and cell division phenotypes of neuronal differentiation. *Cell*. 64: 817-826

Doll T. Meichsner M. Riederer B.M. Honegger P. and Matus A. (1993) An isoform of microtubule-associated protein 2 (MAP2) containing four repeats of the tubulin binding motif. *Journal of Cell Science*. 106:633-640.

Dotti C.G., Sullivan C.A. and Banker G. (1988) The establishment of polarity by hippocampal neurons in culture. *The Journal of Neuroscience*. 8.4:1454-1468.

Ferhat L., Represa A., Bernard A., Ben-Ari Y. and Khrestchatisky M. (1996) MAP2d promote bundling and stabilization of both microtubule and microfilaments. *Journal of Cell Science*. 109:1095-1103.

Ferreira A., Busiglio J. and Caceres A. (1989) Microtubule formation and neurite growth in cerebellar macroneurons which develop in vitro: Evidence for involvement of the microtubule-associated proteins, MAP1a, HMV-MAP2, Tau. *Dev. Brain. Res*. 49:213-228.

Forleo P., Couchie D., Chabas S. and Nunez J. (1996) Four repeat high-mol-wt MAP2 forms in rat dorsal root ganglia. *Journal of Molecular Neuroscience*. 7:193-201.

Friedrich P. and Aszodi A. (1991) MAP2: a sensitive cross-linker and adjustable spacer in dendritic architecture. *FEBS*. 295.1,2,3:5-9.

- Garner C.C. and Matus A. (1988) Different forms of microtubule-associated protein 2 are encoded by separate mRNA transcripts. *Journal of Cell Biology*. 106:779-783.
- Goldenring J.R., Vallano M.L., DeLorenzo R.J. (1985) Phosphorylation of microtubule-associated protein 2 at distinct sites by Calmodulin-dependent and cyclic-AMP-dependent Kinases. *Journal of Neurochemistry*. 45:900-905.
- Goode BL. And Feinstein SC. (1994) Identification of a novel binding and assembly domain in the developmentally regulated inter-repeat region of Tau . *The Journal of Cell Biology*. 124:5;769-782
- Goode B.L., Denis.P.E., Panda D., Radeke M.J., Miller H.P., Wilson L. and Feinstein S.C. (1997) Functional interactions between the proline-rich and repeat regions of Tau enhance microtubule binding and assembly. *Molecular Biology of the Cell*. 8:353-365.
- Guilleminot J., Langkopf A., Nunez J. (1995) Identification of a new exon of the brain microtubule-associated protein 2. *Sciences de la vie/ life sciences*. 318: 959-964.
- Hagestedt T, Lichtenberg B, Wille H, Mandelkow E-M, Mandelkow E (1989) Tau protein become long and stiff upon phosphorylation: correlation between paracrystalline structure and degree of phosphorylation. *Journal of Cell Biology*. 109: 1643-1651.
- Hall Z.W., (1992) An introduction to molecular neurobiology. (Sinauer Ed.) pp247-280.
- Halpain S. and Greengard P. (1990) Activation of NMDA receptor induce rapid dephosphorylation of the cytoskeletal protein MAP2. *Neuron*. 5 : 237-46.
- Heimann R., Shelanski M.L. and Liem R.K.H. (1985) Microtubule-associated proteins bind specifically to the 70-kDa neurofilament protein. *The Journal of Biological Chemistry*. 260.22:12160-12166.

Hernandez M-A., Wandosell F. and Avila J. (1987) Localization of the phosphorylation sites for different kinase in the microtubule-associated protein MAP2. *Journal of Neurochemistry*. 48 :84-93.

Hirokawa N (1982) Cross-linker system between neurofilaments, microtubules and membranous organelles in frog axons revealed by quick-freeze, deep-etching method. *Journal of Cell Biology*. 94 : 129-142.

Hirokawa N. (1991) Molecular architecture and dynamics of neuronal cytoskeleton. *The Neuronal Cytoskeleton* (Burgoyne RD, ed) pp5-74. New-York: Wiley-Liss.

Hirokawa N. (1994) Microtubule organization and dynamics dependant on microtubule-associated proteins. *Current Opinion in Cell Biology*. 6:74-81.

Hirokawa N. (1998) Kinesin and Dynein superfamily proteins and the mechanism of organelle transport. *Science*. 279: 519-526.

Hoshi M., Ohta K., Gotoh Y., Mori A., Murofushi H., Sakai H., Nishida E., (1992) Mitogen-activated-protein-kinase-catalyzed phosphorylation of microtubule-associated proteins, microtubule-associated protein 2 and microtubule-associated protein 4, induces an alteration in their function. *European Journal of Biochemistry*. 203:43-52.

Itoh T.J., Hisanaga S-H. Hosoi T., Kishimoto T. and Hoyani H. (1997) Phosphorylation states of microtubule-associated protein 2 (MAP2) determine the regulatory role of MAP2 in microtubule dynamics. *Biochemistry*. 36:12574-12582.

Julien J-P. (1995) A role for neurofilaments in the pathogenesis of amiotrophic lateral sclerosis. *Biochem. Cell. Biol*. 73:593-597.

Kandel E.R., Schwartz J.H. and Jessell T.M. (1991) Principles of neural science (Appleton et Lange, Thd ed.) pp19, 37-38.

Kindler S., Schulz B., Goedert M., Garner C.C. (1990) Molecular structure of microtubule-associated protein 2b and 2c from rat brain. *The Journal of Biological Chemistry*. 265. 32:19679-19684.

Knops J., Kosik K.S., Lee G., Pardee J.D., Cohen-Gould L., McConlogue L. (1991) Overexpression of Tau in a Nonneuronal cell induces long cellular processes. *The Journal of Cell Biology*. 114 ;4 : 725-733.

Knowles R., Leclerc N. and Kosik K.S. » (1994) Organization of actin and microtubule during process formation in Tau-expressing Sf9 cells. *Cell Motility and the Cytoskeleton*. 28 :256-264.

Kosik K.S., Ferreira R., Knowles R., Leclerc N. and Greenberg S.M. (1995) Linking amyloid precursor protein processing and Tau-related pathology in Alzheimer's disease. *Alzheimer's disease: Lessons from Cell Biology*. 230-240.

Kosik K.S., McConlogue L. (1994) Microtubule-associated protein function: lesson from expression in *Spodoptera frugiperda* cells. *Cell Motility and the Cytoskeleton*. 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 Letters*. 354:259-262

Leclerc N., Kosik K.S., Cowan N., Pienkowski T.P. and Baas P.W. (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.

- Leclerc N., Baas P.W., Garner C.C., Kosik K.S. (1996) Juvenile and mature MAP2 isoforms induce distinct patterns of process outgrowth. *Molecular Biology of the Cell*. 7:443-455.
- Lee V.M-Y. (1995) Disruption of the cytoskeleton in Alzheimer's disease. *Curr. Op. Neurobiol.* 5:663-668.
- Lewis S.A., Wang D. and Cowan N.J. (1988) Microtubule-associated protein MAP2 shares a microtubule binding motif with tau protein. *Science*. 242:936-939.
- Ludin B. and Matus. (1993) The neuronal cytoskeleton and its role in axonal and dendritic plasticity. *Hippocampus*. 3:61-72.
- Marieb E.N. and Laurendeau G. (1993) La cellule : unité de base de la vie In : *Anatomie et physiologie humaines (ERPI)* pp82-4.
- 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. *The Journal of Cell Biology*. 128.6:1081-1093.
- Mattson MP. (1999) Establishment and plasticity of neuronal polarity. *Journal of Neuroscience research*. 57.5: 577-89
- Mcgough A. (1998) F-actin-binding proteins. *Current Opinion in Structural Biology*. 8:166-176
- Mitchison T. and Kirschner M. (1988) Cytoskeletal dynamics and nerve growth. *Neuron*. 1:761-772.
- Miyata Y., Hoshi M., Nishida E., Minami Y. and Sakai H. (1986) Binding of microtubule-associated protein 2 and Tau to the intermediate filament reassembled from

neurofilament 70-kDa subunit protein. *The Journal of Biological Chemistry*. 261.28:13026-13030.

Morishima-Kawashima M. and Kosik K.S. (1996) The pool of MAP kinase associated with microtubules is small but constitutively active. *Molecular Biology of the Cell*. 7:893-905.

Noble M., Lewis SA. and Cowan NJ. (1989) The microtubule binding domain of microtubule-associated protein MAP1b contains a repeated sequence motif unrelated to that of MAP2 and Tau. *Journal of Cell Biology*. 109 :6; 3367-3376.

Olmsted J.B. (1991) Non-motor microtubule-associated proteins. *Current Opinion in Cell Biology*. 3:52-58

Papandrikopoulou A., Doll T., Tucker R.P., Garner C.C. and Matus A. (1989) Embryonic MAP2 lack the cross-linking sidearm sequences and dendritic targeting signal of adult MAP2. *Nature*. 340:650-652.

Puius Y.A., Mahoney N.M. and Almo S.C. (1998) The modular structure of actin-regulatory proteins. *Current opinion in Cell Biology*. 10:23-34.

Reczek D. and Bretscher (1998) The carboxy-terminal region of EBP50 binds to a site in the amino-terminal domain of Ezrin that is masked in the dormant molecule. *The Journal of Biological Chemistry*. 273. 29: 18452-18458.

Rodionov VI., Gyoeva FK., Kashina AS., Kuznetsov SA. And Gelfand VI. (1990) Microtubule-associated proteins and microtubule-based translocators have different binding sites on tubulin molecule. *Journal of Boilological Chemistry*. 265:10; 5702-5707.

Scott J.D., Stofko R.E., McDonald J.R., Comer J.D., Vitalis E.A. and Mangili J.A. (1990) Type II regulatory subunit dimerization determines the subcellular localization of

the cAMP-dependent protein kinase. *The Journal of Biological Chemistry*. 265.35:21561-21566.

Silliman C.C. and Struggill T.W. (1989) Phosphorylation of microtubule-associated protein 2 involves the projection domain. *Biochemical and Biophysical Research Communications*. 160.3:993-998.

Smith C.L. (1994) The initiation of neurite outgrowth by sympathetic neurons grown in vitro does not depend on assembly of microtubules. *The Journal of Cell Biology*. 127.5:1407-1418.

Sontag E., Numbhakdi-Craig V., Bloom G.S. and Mumby M.C. (1995) A novel pool of protein phosphatase 2A is associated with microtubule and is regulated during the cell cycle. *Journal of Cell Biology*. 128 :1131-1144.

Steven's A. and Lowe J. (1992) *La cellule; Appareil respiratoire dans : Histologie (Édition Pradel) pp20-1,130-1. Paris.*

Sutter D and Forscher P (1998) An emerging link between cytoskeletal dynamics and cell adhesion molecules in growth cone guidance. *Current Opinion in Neurobiology*. 8 :106-116.

Tanaka E and Sabry J (1995) Making the connection : Cytoskeletal rearrangements during growth cone guidance. *Cell*. 83 : 171-176.

Taylor S.S. (1989) cAMP-dependent protein kinase. Model for an enzyme family. *Journal of Biological chemistry*. 264:8443-8446.

Tucker R.P. (1990) The role of microtubule-associated proteins in brain morphogenesis : a review. *Brain research reviews*. 15:101-120.

Vallee R.B. (1990) Molecular characterization of high molecular weight microtubule-associated proteins: some answers, many questions. *Cell Motility and the cytoskeleton*. 15:204-209.

Voter W.A. and Erickson H.P. (1982) Electron microscopy of MAP2c (microtubule-associated-protein-2C). *Journal of Ultra-structural research*. 80: 374-82.

Wille H., Mandelkow E-M., Dingus J., Vallee R.B., Binder L.I., Mandelkow E. (1992) Domain structure and antiparallel dimers of microtubule-associated protein 2 (MAP2). *Journal of Structural Biology*. 108:49-61.

Wille H, Mandelkow E-M, Mandelkow E (1992b) The juvenile microtubule-associated-protein MAP2c is a rod-like molecule that forms antiparallel dimers. *Journal of Biological Chemistry*. 267: 10737-10742.

Woody R, Clark D, Roberts G, Martin S and Bayley P (1983) Molecular flexibility in microtubule proteins: proton nuclear magnetic resonance characterization. *Biochemistry*. 22-2186-2192.

Woolf N.J., Zimmerman M. and Johnson G.V.W. (1999) Hippocampal microtubule-associated protein-2 alterations with contextual memory. *Brain research*. 821:241-249.

Yamauchi T. and Fujisawa H.(1988) Regulation of the interaction of actin filaments with microtubule-associated protein 2 by Calmodulin-dependent protein kinase II. *Biochimica et Biophysica Acta*. 968:77-85.

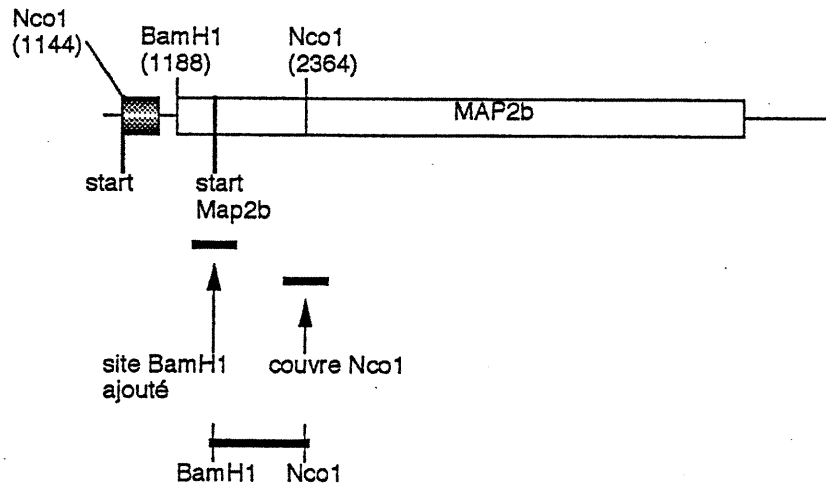
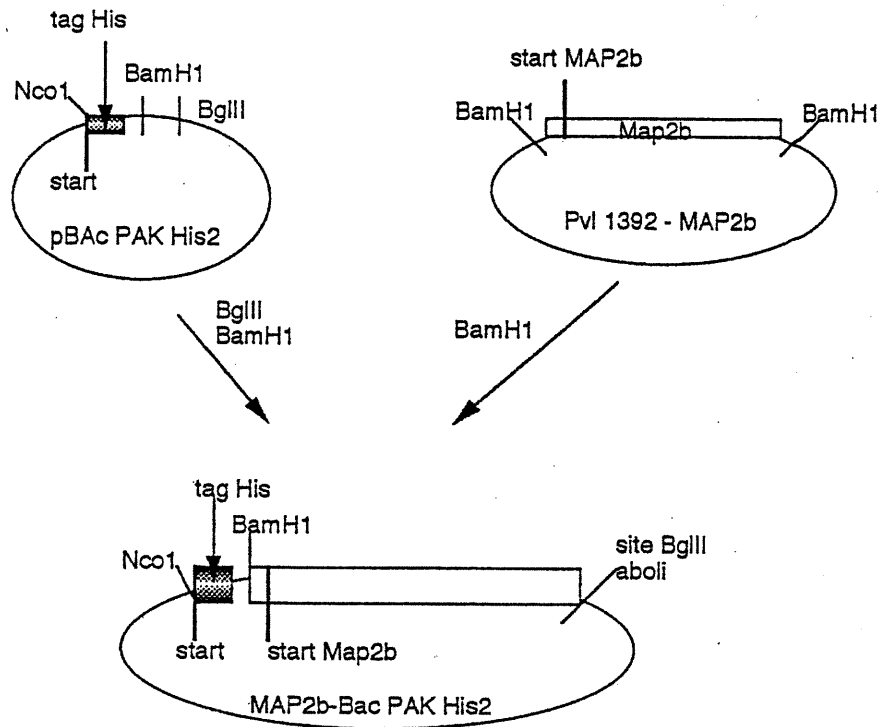
Yang Y., Bauer C., Strasser G., Wollman R., Julien J-P. and Fuchs E. (1999) Integrator of the cytoskeleton that stabilize microtubules. *Cell*. 98:229-238

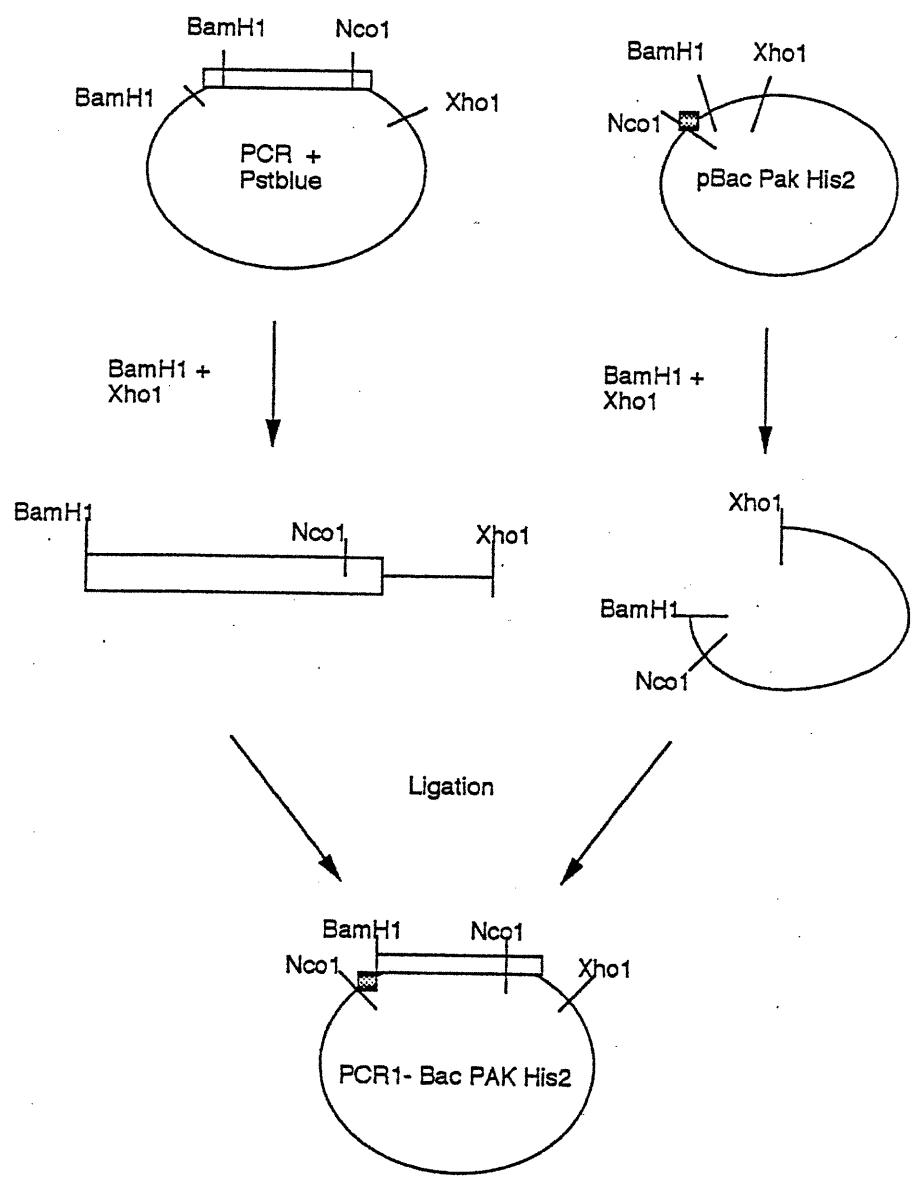
Zittoun R., Samara M., Marie J.P. (4em édition, 1992) Manuel d'hématologie (édition Doin) pp90-1.

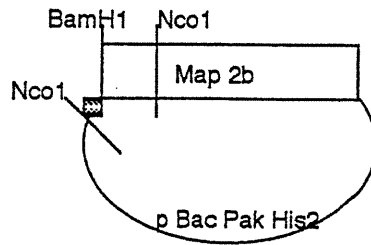
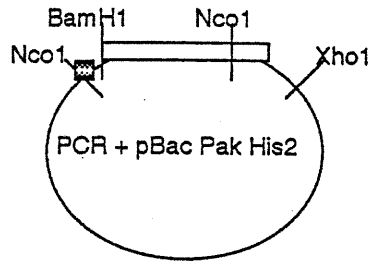
Annexe

Figure A-1: *Stratégie de clonage de MAP2b dans le cadre de lecture du vecteur pBac PAK His2*

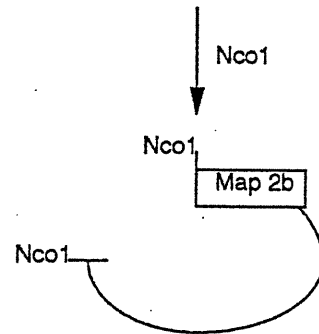
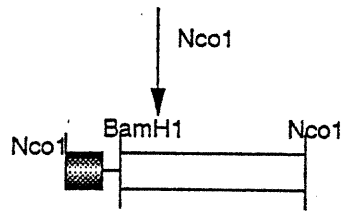
La fabrication de la protéine de fusion MAP2b-His a été faite en trois étapes. Premièrement, l'ADNc de MAP2b clonée dans le pVL1392 a été excisé par BamHI et cloné dans les sites BamHI et BglIII du vecteur pBac PAK His2. Deuxièmement, la séquence non codante de MAP2b a été déléetée en ajoutant (par PCR) un site BamHI en 5' de la séquence codante de MAP2b. Le produit de PCR (amplicon) a été cloné dans le vecteur Pstblue (PCR+Pstblue). PCR+Pstblue contenant le site BamHI a été digéré avec BamHI et XhoI puis cloné dans pBac PAK His2 (PCR1-Bac PAK His2). Troisièmement, PCR1-pBac PAK His2 a été digéré avec NcoI (ce site est compris dans la séquence de MAP2b amplifiée par PCR) puis inséré dans les sites NcoI de MAP2b-Bac PAK His2.



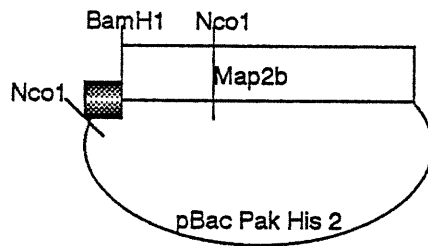




cadre de lecture non respecté



Ligation



Cadre de lecture respecté

Figure A-2: Stratégie de clonage pour la forme mutante MAP2b-1

Pour déléter les nucléotides 656 à 1921 (MAP2b-1), un site Sca1 a été inséré en 3' du nucléotide 656 par PCR. Un amplicon contenant la séquence MAP2b des nucléotides 378 à 656-Sca1 (PCR-C1) a été cloné dans le vecteur PstBlue. L'insertion de PCR-C1 dans le vecteur MAP2b-BacPAK-His2 a été faite en trois étapes. Premièrement, la séquence de 1 à 5471 de MAP2b-His a été sous-clonée dans le vecteur Bluescript aux sites BamHI et XhoI (MAP2b_{1-5471-Bs}). La séquence entre 378 et 1921 de MAP2b a été éliminée par digestion de MAP2b_{1-5471-Bs} avec KasI et ScaI. Deuxièmement, le fragment PCR-C1 cloné dans le vecteur Pstblue a été digéré avec KasI et ScaI et sous-cloné dans les sites KasI et ScaI du vecteur MAP2b_{1-5471-Bs} (C1-MAP2b_{1-5471-Bs}). Finalement, la séquence de MAP2b délétée des nucléotides 656 à 1921 a été coupée de MAP2b_{1-5471-Bs} à l'aide des enzymes BamHI et XhoI et ré-insérée dans le vecteur MAP2b-BacPAK-His2.

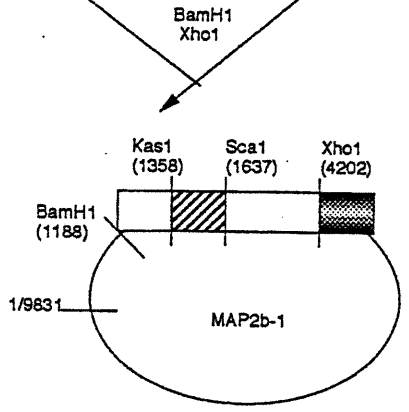
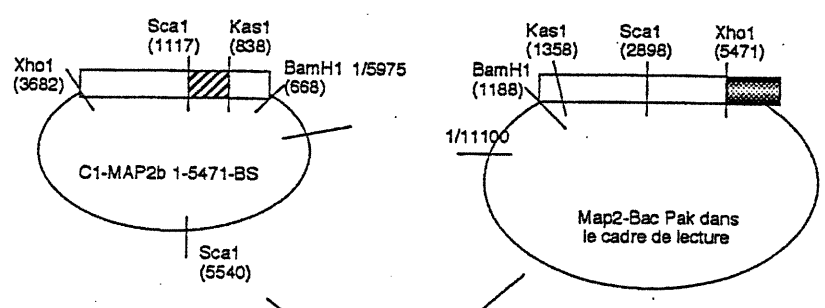
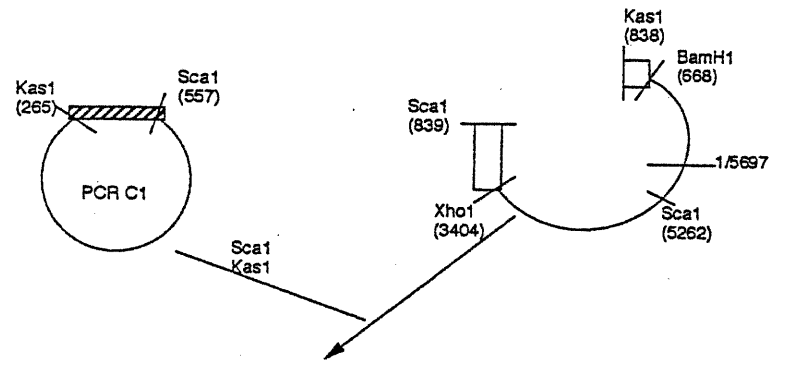
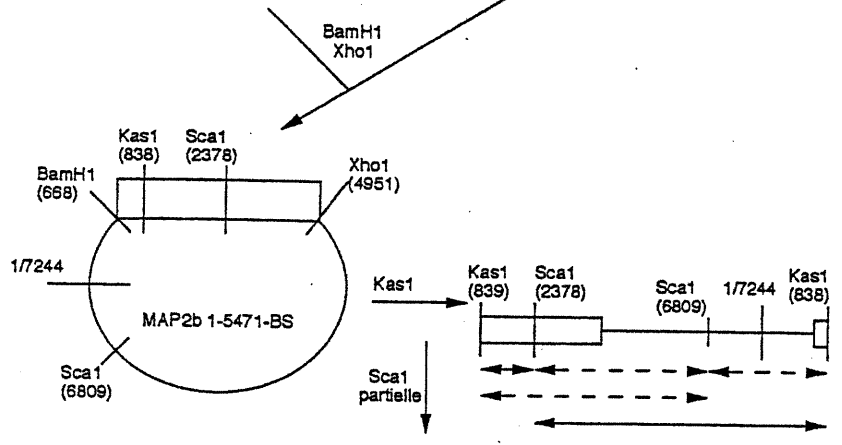
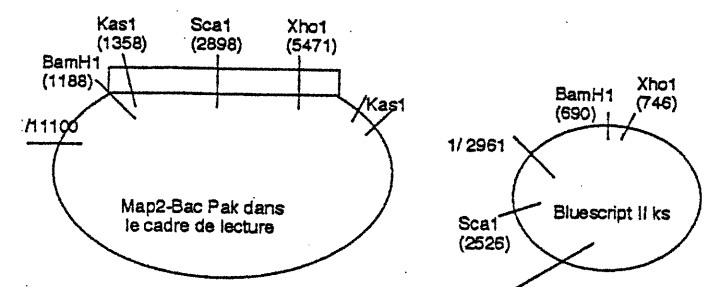


Figure A-3 : Stratégie de clonage pour la forme mutante MAP2b-2

Pour déléter les nucléotides 1921 à 3329 (MAP2b-2), un site XbaI a été inséré en 3' du nucléotide 1921 par PCR. L'amplicon contenant la séquence MAP2b de 378 à 1921-XbaI (PCR-C2) a été cloné dans le vecteur Pstblue. L'insertion de PCR-C2 dans le vecteur MAP2b-Bac-PAK-His2 a été effectuée en trois étapes. Premièrement, la séquence 1 à 3121 de MAP2b-His a été sous-clonée dans le vecteur Bluescript (MAP2b₁₋₃₁₂₁-Bs). Ensuite, PCR-C2, cloné dans le vecteur Pstblue, a été digéré avec KasI et XbaI puis sous-cloné dans les sites correspondants de MAP2b₁₋₃₁₂₁-Bs (C2-MAP2b₁₋₃₁₂₁Bs). Troisièmement, la séquence de MAP2b délétée de 1921 à 3329 a été digérée de C2-MAP2b₁₋₃₁₂₁Bs avec BamHI et XbaI et ré-insérée dans le vecteur MAP2b-Bac-PAK-His2.

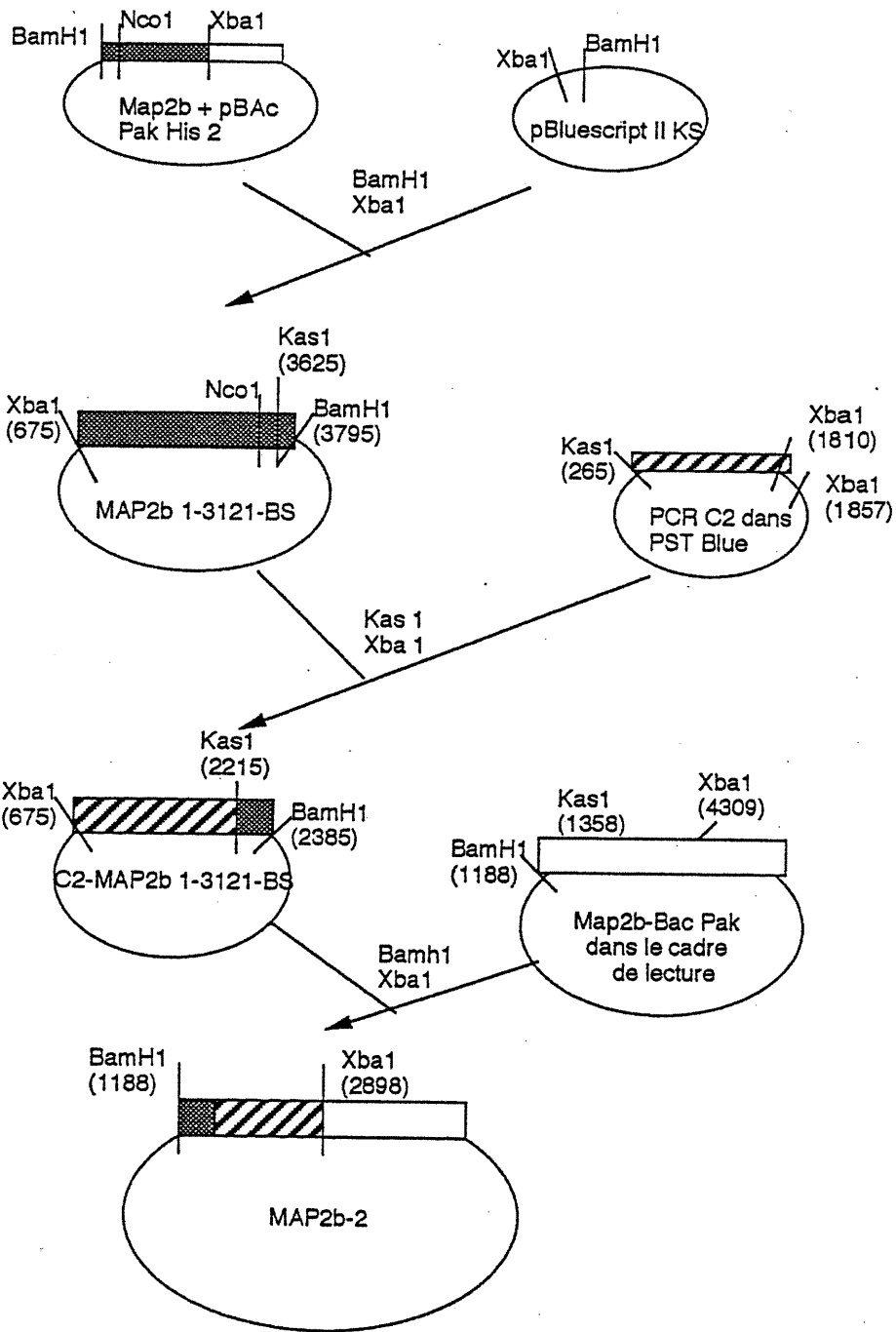


Figure A-4 : Stratégie de clonage pour la forme mutante MAP2b-3

Pour déléter les nucléotides 3329 à 4472 (MAP2b-3), un site XbaI a été inséré en 3' du nucléotide 4472 par PCR. Un amplicon contenant la séquence 3329 à 4472 de MAP2b (PCR-C3) a été cloné en bouts francs dans le vecteur Pstblue. L'insertion de PCR-C3 dans MAP2b-Bac-PAK-His2 a été réalisée en trois étapes. D'abord, les nucléotides 3329 à 5513 de la séquence MAP2b-His ont été clonés dans le vecteur Pstblue (MAP2b-3329-5513Pb) aux sites SphI et XbaI. Ensuite PCR-C3 cloné dans Pstblue a été digéré avec les enzymes SmaI et XbaI et sous-cloné dans les sites correspondants de MAP2b-3329-5513Pb (C3-MAP2b-3329-5513-Pb). Troisièmement, la séquence MAP2b délétée de 3329 à 5513 a été coupée de C3-MAP2b-3329-5513-Pb avec XbaI et SphI puis ré-insérée dans MAP2b-Bac-PAK-His2.

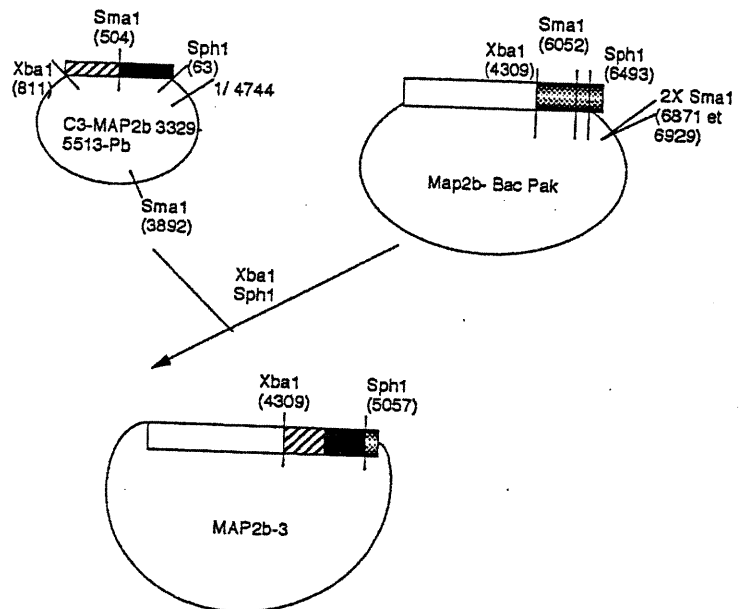
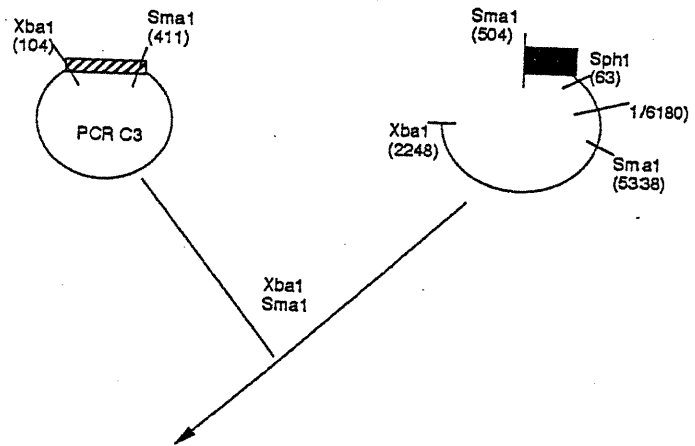
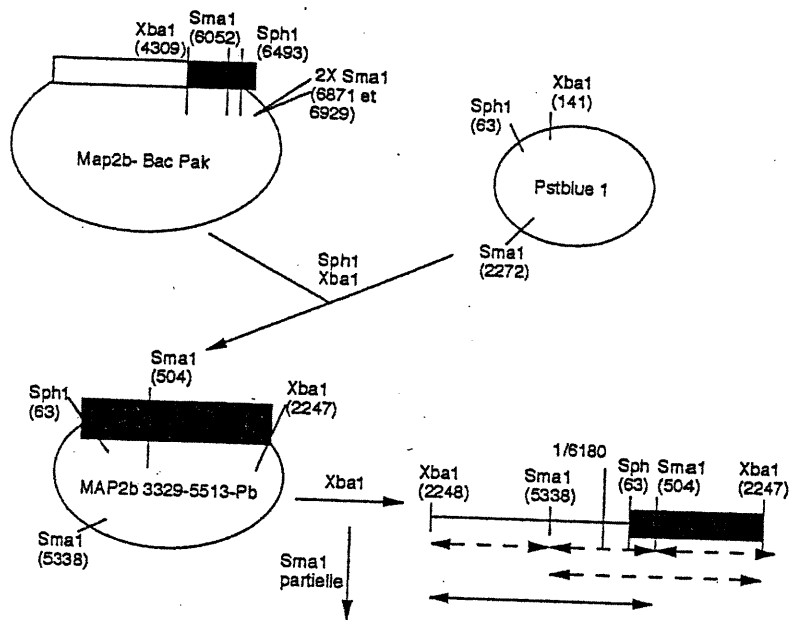


Figure A-5 : Stratégie de clonage pour la forme mutante Mt

La forme tronquée de MAP2b correspondant au domaine de liaison aux microtubules (Mt) a été générée par la délétion des nucléotides 1 à 4472. Un site BamHI a été créé au nucléotide 4765 par PCR. Le vecteur MAP2b-Bac-PAK-His2 a été digéré avec BamHI et SphI. La séquence délétée a été remplacée par l'amplicon digéré avec les mêmes enzymes.

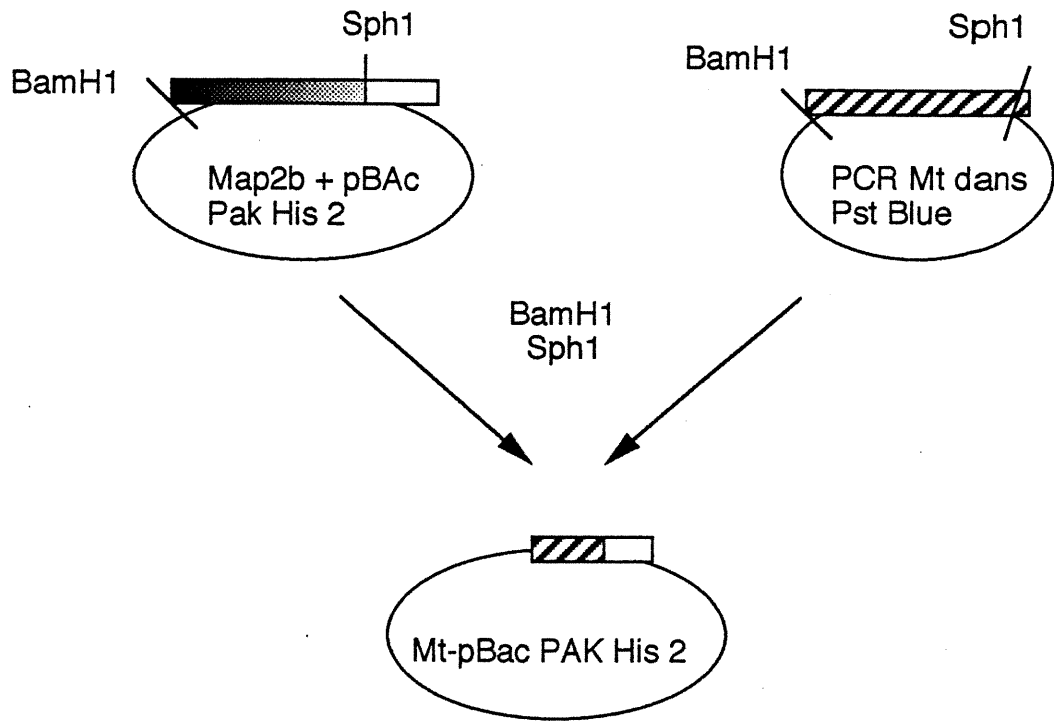


Figure A-6 : Stratégie de clonage pour la forme mutante Prob

La forme tronquée de MAP2b correspondant au domaine de projection de MAP2b (Prob) a été produite par délétion des nucléotides 4772 à 5881. Premièrement, un site NcoI a été créé au nucléotide 4772 de MAP2b par PCR. Le vecteur MAP2b-Bac-PAK-His2 a été digéré avec NotI et XbaI. La séquence délétée a été remplacée par l'amplicon digéré avec les mêmes enzymes.

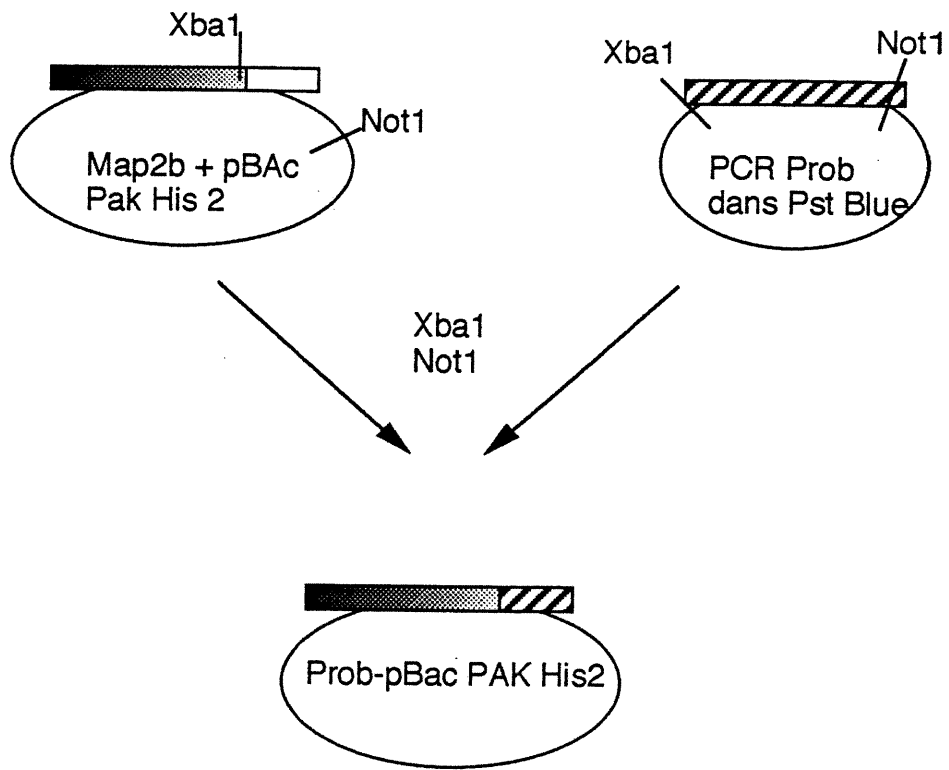
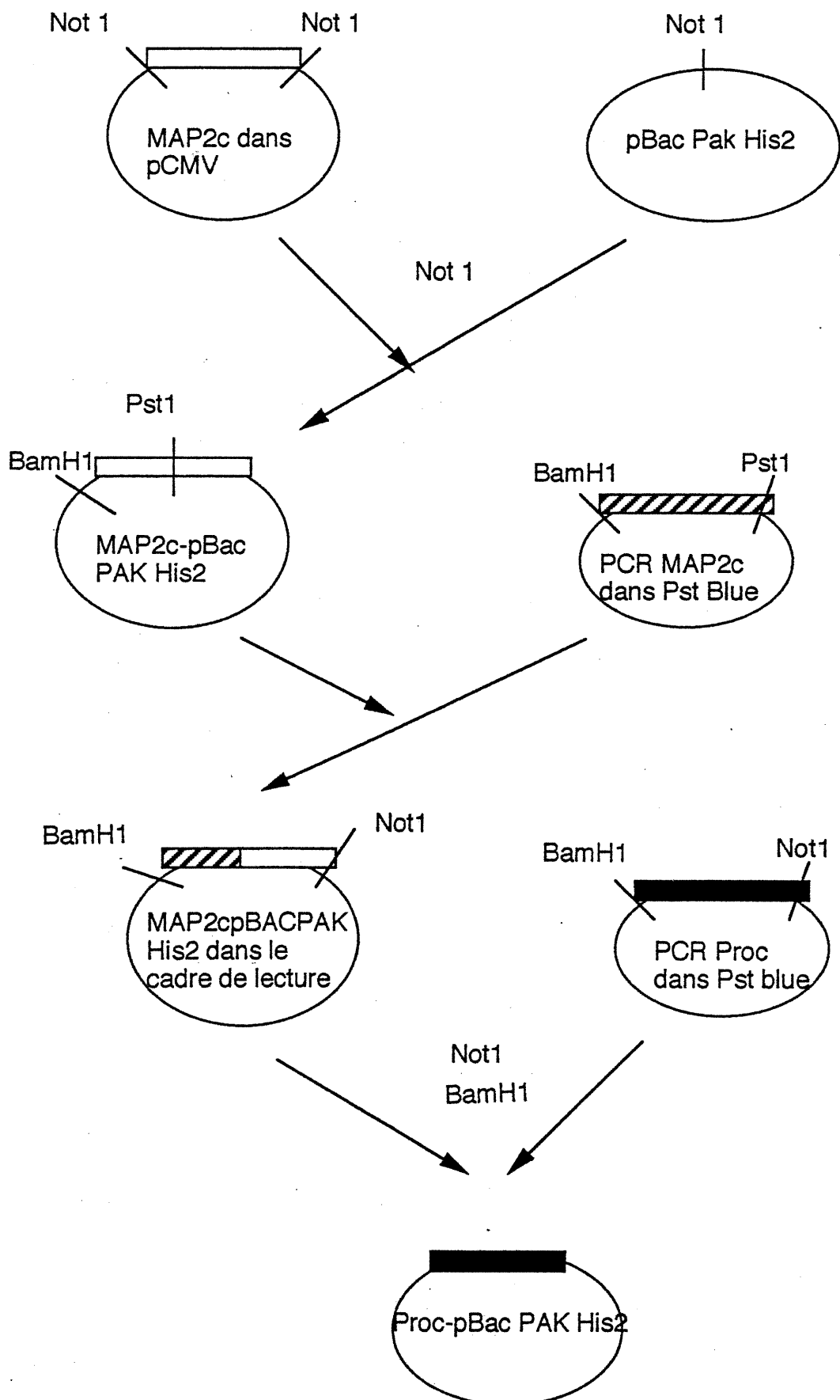


Figure A-7 : Stratégie de clonage pour MAP2c dans le cadre de lecture de pBac PAK His 2 et de la forme mutante Proc

La forme tronquée de MAP2c correspondant au domaine de projection de MAP2c (Proc) a été créée par la délétion des nucléotides 1 à 444. Pour y parvenir, la séquence de MAP2c a été insérée dans le vecteur pBac PAK His2. MAP2c a été excisée du vecteur pCMV par digestion avec NotI et insérée dans pBac PAK His2 au site NotI. Le codon de départ de MAP2c et la région 5' non transcrite ont été enlevés. Pour ce faire, un site BamHI a été créé au codon de départ par mutagenèse dirigée. Le vecteur MAP2c-Bac-PAK-His2 a été digéré avec BamHI et PstI. La portion déléetée a été remplacée par l'amplicon digéré avec les mêmes enzymes.


Afin de générer la forme tronquée de MAP2c correspondant à son domaine de projection (nucléotides 1 à 444), un site BamHI a été inséré par mutagenèse dirigée au nucléotide 444. Le vecteur MAP2c-Bac-PAK-His2 a été digéré par NotI et BamHI. La séquence déléetée a été remplacée par l'amplicon digéré avec les mêmes enzymes de restriction.



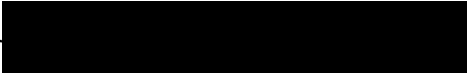
Contribution des différents auteurs pour l'article

Dave Bélanger, étudiant M.Sc., a réalisé la plupart des travaux inclus dans ce mémoire et est premier auteur de l'article qui a découlé de ce travail. Il a rédigé ce mémoire de maîtrise.

Sylvie Cornibert, étudiante M.Sc., a participé de façon importante au séquençage des protéines mutantes produites. Elle a également participé à la fabrication de protéines mutantes.

Signature: 

Carole Abi Farah, étudiante Ph.D, a purifié les protéines produites dans ce projet de maîtrise.

Signature: 

Nicole Leclerc, Ph.D, directeur de recherche, a supervisé les travaux, contribué à l'analyse des résultats et à la rédaction de l'article.

Signature: 