

2m11.2701.9

Université de Montréal

La formation de prolongements cytoplasmiques par tau est altérée différemment par
MAP2b et MAP2c

par

Mathieu Boucher

Département de pathologie et
biologie cellulaire

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

Octobre, 1998

© Mathieu Boucher, 1998

SM 11.2501.0

W

4

U58

1999

V.057

Library of Congress

1000 G Street, N.E.

Washington, D.C. 20540

Telephone: (202) 707-6000

Internet: <http://www.loc.gov>

Library of Congress

Library of Congress

Library of Congress

Library of Congress

Library of Congress

Library of Congress

Université de Montréal

Faculté des études supérieures

Ce mémoire intitulé:

La formation de prolongements cytoplasmiques par tau est altérée différemment
par MAP2b et MAP2c.

présenté par:

Mathieu Boucher

a été évalué par un jury composé des personnes suivantes:

Dr. Ivan Robert Nabi

Dr. Nicole Leclerc

Dr. Clermont Beaulieu

Dr. Vincent Castellucci

Mémoire accepté le99-03-31.....



SOMMAIRE

Au cours du développement du système nerveux, les protéines associées aux microtubules (MAPs), plus particulièrement MAP2 et tau, jouent un rôle important dans l'élaboration des prolongements dendritiques et axonaux par un neurone. L'expression des protéines MAP2 et tau est régulée par épissage alternatif, générant ainsi des isoformes juvéniles et matures, selon le stade de développement du neurone. Nos études antérieures ont montré que ces différentes isoformes jouent des rôles distincts dans l'élaboration de prolongements cytoplasmiques. En effet, nous avons montré que l'expression individuelle de l'isoforme juvénile de MAP2, MAP2c, de l'isoforme adulte de MAP2, MAP2b et des isoformes de tau dans les cellules ovariennes d'insecte Sf9 à l'aide d'un vecteur baculoviral induit un pattern distinct d'élaboration de prolongements cytoplasmiques. MAP2c induit généralement la formation de multiples prolongements fins similaires aux neurites mineures qui deviendront les dendrites et l'axone alors que MAP2b induit généralement la formation d'un seul prolongement court et trapu qui ressemble à une dendrite. L'expression de tau résulte en la formation d'un seul prolongement long et fin similaire à un axone. De plus, 60% des cellules qui expriment MAP2c développent des prolongements contre seulement 30% dans le cas des cellules exprimant MAP2b. Plus de 90% des cellules qui expriment tau présentent des prolongements. La production de prolongements cytoplasmiques par MAP2b, MAP2c et tau est accompagnée par la formation de microtubules dans les cellules Sf9. Cette observation démontre bien que l'activité de ces MAPs dans les cellules Sf9 est très similaire à celle dans les neurones.

Ces différentes isoformes de MAP2 et tau sont co-exprimées au cours des stades précoces de différenciation d'un neurone. Ainsi le pattern de formation de dendrites et d'axone résulte donc d'un équilibre fonctionnel entre ces dernières. Pour mieux comprendre cet équilibre, nous avons co-exprimé deux de ces MAPs dans les cellules Sf9. Nous avons ainsi montré que la formation de prolongements cytoplasmiques par l'isoforme juvénile de tau est affectée différemment par l'expression de MAP2b et MAP2c. MAP2b réduit de façon considérable la capacité de tau à induire la formation de prolongements cytoplasmiques. Par contre, tau affecte la capacité de MAP2c à induire la formation de prolongements multiples.

Une étude antérieure a montré que tau redistribue et stabilise les microfilaments d'actine (actine-F) dans les cellules Sf9. Nous avons donc investigué les effets de MAP2b et MAP2c sur la distribution et la stabilisation de l'actine-F dans les cellules Sf9. L'expression de MAP2b et MAP2c influence la distribution de l'actine-F dans les

cellules Sf9. De plus, nous avons démontré par un marquage à l'or colloïdal que MAP2c et MAP2b co-localisent avec l'actine-F dans les cellules Sf9. Finalement, nous avons montré que MAP2b et MAP2c stabilisent l'actine-F dans les cellules Sf9 comme rapporté pour tau. Cependant, MAP2b semble stabiliser l'actine-F à un stade plus précoce de l'infection que tau. Nos observations indiquent que MAP2b, MAP2c et tau peuvent influencer l'organisation des microtubules et des microfilaments d'actine dans les cellules Sf9. Par conséquent, le pattern d'élaboration de prolongements cytoplasmiques généré par la co-expression de ces MAPs pourrait résulter d'une compétition fonctionnelle entre ces MAPs pour interagir avec ces deux éléments du cytosquelette.

Mots clés: protéines de liaison aux microtubules (MAPs), microtubules, microfilaments d'actine, baculovirus, différenciation morphologique.

TABLE DES MATIERE

Sommaire.....	II
Liste des figures.....	VI
Liste des sigles et abréviations.....	VII
Remerciements.....	VIII

CHAPITRE PREMIER

INTRODUCTION GENERALE.....	2
Relation entre morphologie et fonction cellulaire: rôle du cytosquelette.....	2
Les protéines de liaison aux microtubules (MAPs).....	3
Les protéines de liaison à l'actine (ABPs).....	4
Distribution intracellulaire des MAPs et ABPs dans les neurones.....	5
Rôles de MAPs au cours de la différenciation neuronale et dans les maladies neurodégénératives.....	6
Différentes isoformes de MAP2 dans le système nerveux.....	7
Élaboration de prolongements cytoplasmiques: MAPs, microtubules et microfilaments d'actine.....	8
OBJECTIFS DU PRESENT TRAVAIL.....	10

CHAPITRE DEUXIEME

LA FORMATION DE PROLONGEMENTS CYTOPLASMIQUES PAR LA PROTÉINE TAU EST ALTÉRÉE DIFFÉREMMENT PAR L'EXPRESSION DES PROTÉINES MAP2b ET MAP2c DANS LES CELLULES SF9.....	12
---	----

CHAPITRE TROISIEME

DISCUSSION GENERALE ET CONCLUSIONS.....49

Le pattern de production de prolongements cytoplasmiques varie en fonction du ratio MAP2b/MAP2c, MAP2b/tau et MAP2c/tau dans les cellules Sf9.....	51
MAP2b et MAP2c réorganisent et stabilisent l'actine-F dans les cellules Sf9.....	54
Rôle distinct des isoformes MAP2c et MAP2b dans l'élaboration des neurites.....	58

CHAPITRE QUATRIEME

BIBLIOGRAPHIE.....61

ANNEXE

LISTE DES FIGURES (Chapitre 2)

	page
<u>Figure 1</u>	38
Montage illustrant, en immunofluorescence, la co-expression de MAPs pour différents ratio de multiplicité d'infection dans les cellules Sf9.	
<u>Figure 2</u>	40
Histogrammes du nombre de prolongements par cellules et du nombre de cellules avec ou sans prolongement dans les cellules Sf9 co-exprimant des MAPs.	
<u>Figure 3</u>	42
Montage illustrant, en immunofluorescence, la distribution de l'actine-F et des microtubules dans les cellules Sf9 exprimant MAP2c et MAP2b.	
<u>Figure 4</u>	44
Montage illustrant la localisation subcellulaire de MAP2c et MAP2b dans les cellules Sf9.	
<u>Figure 5</u>	46
Montage illustrant, en immunofluorescence, l'effet de CD sur les patterns d'élaboration des prolongements cellulaires induits par les protéines MAP2c, MAP2b et tau ainsi que par le baculovirus de type sauvage.	
<u>Figure 6</u>	48
Histogrammes du nombre de prolongements par cellule dans les cellules exprimant MAP2b, MAP2c et tau, traitées ou non à la CD.	

LISTE DES SIGLES ET ABRÉVIATIONS

MAP.....	Microtubule-associated protéin
ABP.....	Actin-binding protein
ARNm.....	Acide ribonucléique messenger
Sf9.....	Spodoptera frugiperda
dBcAMP.....	Dibutyryladosine 3':5'-cyclic monophosphate
PC12.....	Adrenal pheochromocytoma
HEK.....	Human embryonic kidney
CD.....	Cytochalasin D

REMERCIEMENTS

Je tiens à remercier mon directeur de recherche Nicole Leclerc, ainsi que mon co-directeur de recherche Clermont Beaulieu pour leur support, leur aide et tout ce qu'ils m'ont appris. J'aimerais aussi remercier Annie Vallée pour sa participation et son grand support. Et finalement, j'aimerais dire un gros merci ma mère Lise et mon père Bernard qui me supporte depuis toujours.

Chapitre premier

INTRODUCTION GÉNÉRALE

et

OBJECTIFS DU TRAVAIL

Relation entre morphologie et fonction cellulaire: rôle du cytosquelette

La morphologie élaborée par les différents types de cellules eucaryotes est étroitement reliée à la fonction de celles-ci. On peut penser par exemple aux cellules à bordure en brosse de l'oreille interne. Celles-ci possèdent de nombreux cils stéréoscopiques qui agissent comme détecteur primaire du son, transmettant un signal électrique au cerveau en réponse aux vibrations sonores ambiantes. Un autre exemple sont les cellules épithéliales de l'intestin et leurs microvillosités, une morphologie permettant d'obtenir une surface d'absorption jusqu'à vingt fois plus importante que dans le cas d'une paroi plane. De plus, le battement synchrone de ces villosités permet le déplacement des substances à la surface du tissu épithélial (Alberts et al., 1995). Dans le cas des neurones, qui peuvent atteindre jusqu'à un mètre de longueur tout en gardant un faible diamètre, et qui présentent de multiples ramifications, leur morphologie permet le transport de l'influx nerveux sur de longues distances et ce, vers de nombreuses cibles telles des cellules musculaires ou d'autres neurones. Le cytosquelette est le principal élément structural responsable de la forme adoptée par les cellules. Ses composantes majeures sont les microtubules, microfilaments d'actine (F-actine) et les filaments intermédiaires (Fulton, 1984). Les microtubules sont des polymères de tubuline formés de 13 protofilaments parallèles composés de sous-unités α - et β - tubuline agencées en alternance. Les microtubules sont des structures polaires par le fait qu'ils polymérisent de façon préférentielle à une des deux extrémités du microtubule. Ils jouent un rôle architectural important dans l'élaboration et le maintien de la morphologie cellulaire, et sont également impliqués dans le transport intracellulaire des organites et des autres composantes cytosquelettiques (Alan et al., 1991; Hirokawa, 1991). Les microfilaments se composent de monomères d'actine (actine-G) assemblés sous forme de longs polymères polarisés (Fulton, 1984). De façon similaire aux microtubules, les microfilaments sont des entités polaires. Ils sont les principaux constituants d'un dense réseau cortical, le cortex cellulaire, situé sous la membrane

cytoplasmique. Leur concentration est plus importante au niveau des points d'attache de la membrane à la matrice extracellulaire, de même que dans les régions de haute motilité cellulaire (Herman, 1993). Contrairement aux microfilaments et aux microtubules, les protéines qui forment les filaments intermédiaires varient considérablement quant à leur composition. Ces grandes variations dépendent du type de cellules ainsi que de la régulation exercée sur les différentes isoformes au cours du développement (Heins and Aebi, 1994). Le principal rôle connu des filaments intermédiaires est de conférer aux cellules une certaine résistance face à un stress mécanique. Ils pourraient également jouer un rôle important dans l'immobilisation du calcium libre axoplasmique (Shaw G., 1991). Finalement, les filaments intermédiaires ne sont pas des structures polaires comme les microtubules et les microfilaments.

Les protéines de liaison aux microtubules (MAPs)

La différenciation morphologique des cellules implique une réorganisation du cytosquelette en structures spécifiques aux différents compartiments cellulaires. Cette distribution intracellulaire des composantes du cytosquelette se fait sous le contrôle de protéines régulatrices et de liaison. Plus particulièrement, les protéines associées au microtubules (MAPs) favorisent l'assemblage des microtubules en réduisant la concentration critique de tubuline nécessaire au processus d'élongation et en réduisant l'instabilité dynamique (Ferreira et al., 1989; Lee, 1990; Olmsted, 1991) (Mandelkow et al., 1995). Elles permettent ainsi la stabilisation du cytosquelette, jouant ainsi un rôle important dans le maintien de l'intégrité morphologique cellulaire. La régulation de l'activité des MAPs implique, entre autres, un contrôle de leur état de phosphorylation. Elles sont en effet des substrats des protéines kinases et leur phosphorylation peut induire une modification de leur conformation ou de leur charge globale susceptible de modifier leur affinité pour les différents éléments du cytosquelette (Yamauchi and Fujisawa, 1988; Hagestedt et al., 1989; Steiner et al., 1990; Brugg and Matus, 1991)

(Mandelkow, et al., 1995). Les MAPs permettent les interactions des microtubules entre eux, de même qu'entre les microtubules et les autres structures à l'intérieur du cytoplasme.

Les protéines de liaison à l'actine (ABPs)

Les protéines connues sous le nom de *protéines de liaison à l'actine* (ABPs) sont responsables de réguler l'assemblage des microfilaments d'actine. Elles se divisent en quatre classes : une première classe régule la polymérisation de l'actine en séquestrant l'actine monomérique (actine-G) ou en bloquant l'élongation des filaments en se liant à leurs extrémités (ex. cofiline et gelsoline); une deuxième classe stabilise l'actine-F (ex. tropomyosine); une troisième classe induit la mise en faisceaux des filaments d'actine et la formation de réseaux actiniques complexes (ex. ABP-280, α -actine et scruine); une quatrième classe lie l'actine à la membrane plasmique (ex. spectrine et ankyrine) (Bamburg and Bernstein, 1991). Cependant, des études récentes ont permis de mettre en évidence le rôle de la géométrie des filaments dans leurs interactions avec les ABPs. Les ABPs se lient à l'actine-F en interagissant avec le sillon du filament d'actine (McLaughlin et Weeds, 1995). Cependant, la liaison d'une ABPs au filament peut parfois entraîner une modification géométrique du filament plutôt qu'à un changement de conformation de la sous-unité d'actine, résultant en une modification de l'affinité de ce filament pour d'autres ABPs (McGough, 1998). Jusqu'à ce jour, les sites de liaisons de huit familles d'ABPs (incluant les toxines exogènes) ont été identifiés sur les microfilaments: myosine, tropomyosine, scruine, α -actinine (et les protéines associées calponine et fimbrine), cofiline, caldesmone, gelsoline et phalloïdine, la dernière étant une toxine. Par exemple, cofiline se lie aux sous-domaines 1 et 3 à la base du monomère d'actine et change la géométrie du filament et le rend plus susceptible de se briser; fimbrine se lie à la surface externe des sous-domaines 1 et 2 et induit un mouvement du sous-domaine 1 de l'actine.

Distribution intracellulaire des MAPs et des ABPs dans les neurones

C'est au cours de leur différenciation que les neurones élaborent des prolongements, les axones et les dendrites, afin d'atteindre une morphologie distinctive étroitement liée à la façon dont l'information sera traitée. Les dendrites sont généralement nombreuses mais relativement courtes. Leur diamètre est large au niveau du soma et décroît à mesure que l'on s'éloigne de celui-ci (Bartlett and Banker, 1984; Hillman, 1988). L'axone est généralement unique et très long. Son diamètre est fin et demeure constant sur toute sa longueur (Bartlett and Banker, 1984; Hillman, 1988).

Mis à part leurs morphologies distinctes, les dendrites et les axones diffèrent également par l'organisation moléculaire de leur cytosquelette. Tant les dendrites que les axones contiennent de denses faisceaux de microtubules orientés paraxialement (Hirokawa, 1991). L'organisation de ces faisceaux n'est cependant pas la même dans les deux types de neurites et dépend énormément du contenu protéique des prolongements. On observe une distribution distinctive des différentes MAPs dans les prolongements neuronaux selon qu'il s'agissent d'axones ou de dendrites: on retrouve la protéine *tau*, une MAP de faible poids moléculaire (48-67 kD), presque exclusivement au niveau des axones, alors que la protéine MAP2, une MAP de haut poids moléculaire (280 kD), est plus particulièrement associée aux dendrites (Caceres et al., 1984; Peng et al., 1986; Kosik and Finch, 1987; Ferreira, et al., 1989). De façon similaire, les neurones possèdent des mécanismes permettant la ségrégation spécifique de certaines ABPs dans les compartiments axonaux et dendritiques. Les deux formes neuronales de la spectrine, une ABP permettant l'interconnection d'une grande variété d'éléments structuraux, peuvent par exemple être différenciellement localisées: une dans l'axone et l'autre dans les dendrites (Bamburg and Bernstein, 1991). Les deux formes sont présentes dans le soma (Bamburg and Bernstein, 1991). Les filaments intermédiaires (neurofilaments au niveau des neurones) sont présents au niveau des dendrites en un nombre plus ou moins

grand mais constituent une composante importante des axones, plus particulièrement ceux qui sont larges et myélinisés (Shaw G.,1991).

Rôles des MAPs au cours de la différenciation neuronale et dans les maladies neurodégénératives

Le ciblage sélectif des protéines du cytosquelette semble jouer un rôle important dans la différenciation des axones et des dendrites en des compartiments morphologiquement et biochimiquement distincts. Il a été démontré que MAP2 et *tau* jouent un rôle clé dans la formation des prolongements dendritiques et axonaux. Dans des cultures primaires de neurones, suite à la formation de neurites exploratoires, un de ceux-ci formera l'axone alors que les autres deviendront les dendrites (Dotti et al., 1988). Le simple fait de supprimer l'expression de MAP2 empêche le développement de neurites exploratoires alors que la suppression de *tau* contrevient à la différenciation axonale et au maintien structural de l'axone (Caceres and Kosik, 1991; Caceres et al., 1992). Il semblerait donc que le rôle de MAP2 dans la différenciation morphologique d'un neurone précède celui de *tau*. Le maintien de la structure dendritique est quant à lui assuré par MAP2 dans les neurones matures (Sharma et al., 1994). Les interactions moléculaires qui régissent les fonctions de MAP2 en tant que déterminant moléculaire de la morphologie distinctive des neurones demeurent jusqu'à ce jour que partiellement comprises.

MAP2 et *tau* sont impliquées dans des désordres du système nerveux. Une augmentation de l'expression de MAP2 est observée dans les larges neurones des dysplasies corticales, une malformation du cortex cérébral observée notamment chez des patients épileptiques (Yamanouchi et al., 1996). Les patients souffrant de schizophrénie présentent généralement une diminution de la concentration de MAP2 (Arnold et al., 1991). Un fait intéressant est la perte similaire de MAP2 observée chez les rats adultes suite à une inhibition de la tryptophane hydroxylase, l'enzyme de synthèse de la

sérotonine (Kikuchi and Kim, 1993). Les corps de Lewy, présents dans certains types de neurones chez les patients atteints de la maladie de Parkinson et de la maladie à corps de Lewy diffus, se composent entre autre de la protéine associée aux microtubules MAP5 et quelques fois de MAP2 (Gai et al., 1996). La présence de MAPs dans les corps de Lewy suggère un certain désordre du cytosquelette associé à la maladie neurodégénérative de Parkinson. La maladie d'Alzheimer est peut-être le meilleur exemple de maladie neurodégénérative associée au cytosquelette. Elle est caractérisée par une perte de l'intégrité du cytosquelette neuronal corrélée à une hyperphosphorylation de la protéine *tau* (Lee, 1995). Cette dernière n'est alors plus capable de se lier aux microtubules et perdrait alors toute fonctionnalité, causant ainsi un déséquilibre au niveau de l'intégrité axonale (Mandelkow, et al., 1995).

Différentes isoformes de MAP2 dans le système nerveux

Plusieurs isoformes de MAP2 participent à la formation et à la différenciation des neurites (Tucker, 1990). Ces différentes isoformes sont obtenues soit par épissage alternatif du transcrit unique codant pour MAP2, soit par transformations post-traductionnelles du peptide (Hirokawa, 1994). Chez l'embryon, aux premiers stades de la différenciation neuronale, deux isoformes sont présentes: un peptide de 467 acides aminés, représentant l'isoforme juvénile (MAP2c) de faible poids moléculaire (~70kDa) et un peptide de 1828 acides aminés, représentant l'isoforme mature (MAP2) de haut poids moléculaire (280 kD). C'est par épissage alternatif que sont éliminés les 1372 acides aminés du peptide mature en vue d'obtenir l'isoforme juvénile (Neve et al., 1986; Papandrikopoulou et al., 1989). Le mécanisme d'épissage subirait donc un contrôle négatif au cours du développement, MAP2c n'étant plus présent chez l'adulte (Ludin & Matus, 1993). La forme mature de MAP2 existe en deux isoformes, MAP2a et MAP2b. La différence moléculaire entre ces deux isoformes, contrairement à ce qui a été suggéré, ne serait pas générée par une phosphorylation de MAP2b afin d'obtenir MAP2a.

Il s'agirait plutôt d'un épissage alternatif du pré-ARNm (Chung et al., 1996). L'isoforme MAP2b serait la première à apparaître au cours du développement (Tucker, 1990). On retrouve la forme mature presque exclusivement au niveau des dendrites. L'isoforme juvénile de MAP2, MAP2c, se retrouve dans le compartiment dendritique et axonal (Tucker, 1990; Ludin et Matus, 1993). Il existe également une isoforme de faible poids moléculaire spécifique aux cellules gliales, nommée MAP2d (Ferhat et al., 1994b; Ferhat et al., 1996). Il s'agit d'une isoforme légèrement plus grande que MAP2c dû à la présence d'une séquence supplémentaire de liaison à la tubuline entre le premier et le deuxième des quatre séquences que possèdent les différentes isoformes de MAP2 (Doll et al., 1993). Finalement, de nouvelles variantes de l'isoforme de haut poids moléculaire ont été retrouvées au niveau de la moëlle épinière (Couchie et al., 1996).

Élaboration de prolongements cytoplasmiques: MAPs, microtubules et microfilaments d'actine

La mise en évidence et l'élucidation des mécanismes grâce auxquels une MAP exerce ces effets nécessite le recours à des modèles *in vitro*, où les facteurs en causes peuvent être considérés isolément les uns des autres. La transfection de cellules ovariennes d'insecte (Sf9) à l'aide d'un vecteur baculoviral transportant des matériaux génétiques définis, constitue un outil de choix à cet égard. Grâce à cette approche, il a été démontré que l'expression individuelle des MAPs neuronales (la MAP axonal tau, la MAP dendritique MAP2 et la MAP dendritique et axonal MAP2c) dans les cellules Sf9, induit des prolongements cytoplasmiques qui présentent des caractéristiques morphologiques des neurones (Kosik and McConlogue, 1994). Ainsi l'expression de la protéine tau entraîne la production de prolongements uniques, fins et allongés, qui ressemblent à des axones, celle de MAP2b la production de prolongements trapus et courts, qui ressemblent à des dendrites et celle de MAP2c la production de

prolongements multiples et fins, qui ressemblent aux neurites aux stades précoces de la différenciation neuronale (Knops et al., 1991; Leclerc et al., 1993; Leclerc et al., 1996).

Ce sont les microtubules et les microfilaments qui constituent les principaux éléments du cytosquelette impliqués dans l'élaboration de prolongements cytoplasmiques (Mitchison and Kirschner, 1988; Tanaka and Sabry, 1995). Un modèle comportant trois étapes a été proposé par Mitchison et Kirschner: tout d'abord, un système d'actine permet l'orientation des microtubules qui dirigeront l'élongation orthogonalement au périmètre cellulaire, ensuite une phase de consolidation où les différents microtubules filopodiaux sont capturés en un site commun sous la membrane cytoplasmique et stabilisés dans la direction de l'élongation, et finalement une phase de conversion permettant la stabilisation des faisceaux de microtubules à l'intérieur du tube axonal (Mitchison and Kirschner, 1988). La relation étroite entre l'actine et les microtubules au cours de la formation de neurites a été décrites dans différents systèmes. Par exemple, il a été démontré que la formation de microtubules n'est pas nécessaire pour initier la croissance de neurites au niveau des neurones sympathiques (Smith, 1994). L'initiation se fait alors par le biais d'un système d'actine. Les microtubules sont toutefois essentiels au processus d'élongation. Un autre exemple est l'incapacité des microtubules à pénétrer le riche réseau actinique des cônes de croissance, à moins d'affaiblir ce réseau par un traitement à la cytochalasine D, un agent de dépolymérisation de l'actine filamenteuse (Létourneau et al., 1987; Forscher and Smith, 1988).

Afin d'élucider les mécanismes de régulation impliqués dans l'élaboration des neurites, il est primordiale d'identifier les différentes molécules permettant la coordination des microtubules et des microfilaments et de comprendre leur mode d'action spécifique. Les résultats que nous avons obtenus au cours des dernières années, nous indiquent que les isoformes de MAP2 pourraient être impliquées dans l'interaction moléculaire des microtubules et des microfilaments d'actine. En effet, lorsque MAP2c ou MAP2b exprimée dans les cellules Sf9 est purifiée et microinjectée dans des cellules

de mélanome qui n'expriment la protéine de liaison à l'actine, ABP-280 et ainsi présentent donc une instabilité de la membrane cytoplasmique, il y a stabilisation de la membrane (Cunningham et al, 1992; Cunningham et al., 1997). Ceci indique que le réseau d'actine corticale a été stabilisé. Cependant, MAP2c mais pas MAP2b induit la formation d'une lamellipode de laquelle émergent dans prolongements cytoplasmiques remplis de microtubules (Cunningham et al., 1997). La formation d'une lamellipode indique qu'il y a formation d'un réseau actinique complexe. Cette étude démontre donc que MAP2c et MAP2b ont des effets distincts sur l'organisation de l'actine et que ceci influence leur capacité à induire la formation de prolongements cytoplasmiques.

Objectif de ce travail

Plusieurs isoformes de MAPs sont co-exprimées et co-localisent dans les neurones au cours de leur différenciation. L'expression individuelle de certaines de ces MAPs dans les cellules ovariennes d'insecte, Sf9, à l'aide d'un vecteur baculoviral induit la formation de prolongements cytoplasmiques selon un pattern distinct. Par exemple, l'isoforme juvénile de MAP2, MAP2c induit la formation de prolongements multiples alors que l'isoforme adulte, MAP2b induit la formation d'un prolongement trapu et unique (Leclerc et al., 1996). L'isoforme juvénile de tau induit la formation d'un prolongement unique, long et fin (Knops et al., 1991; Leclerc et al., 1996). Ces résultats suggèrent donc que dans les neurones, la pattern final de production de prolongements dendritiques et axonaux résulte d'un équilibre fonctionnel entre ces différentes MAPs.

La production de prolongements cytoplasmiques est reliée à une réorganisation des microtubules et de l'actine-F. Le fait que l'expression de MAPs dans les cellules Sf9 résulte en la formation de prolongements cytoplasmiques indique que ces MAPs réorganisent les microtubules et l'actine-F dans ces cellules. En effet, une étude

antérieure a démontré que l'actine-F est impliquée dans la production de prolongements cytoplasmiques par la MAP, tau dans les cellules Sf9 (Knowles et al., 1994).

Au cours de cette étude, nous réaliserons les expériences suivantes afin de caractériser la fonction distincte de MAP2c et MAP2b dans l'élaboration de prolongements cytoplasmiques:

1) Nous allons d'abord effectué des études de co-expressions de ces différentes MAPs dans les cellules Sf9 afin de comprendre l'équilibre fonctionnel qui existe entre celles-ci. Plus particulièrement, nous déterminerons si le pattern de production de prolongements cytoplasmiques d'une MAP prédomine sur celui de l'autre MAP.

2) Puisque l'élaboration de prolongements par la cellule nécessite non seulement la réorganisation des microtubules, mais aussi celle de l'actine-F, nous examinerons la distribution des filaments d'actine dans les cellules Sf9 exprimant MAP2c et MAP2b

3) Afin de confirmer l'interaction (directe ou indirecte) de MAP2b et MAP2c avec l'actine-F dans les cellules Sf9, nous examinerons leur localisation subcellulaire en utilisant un marquage à l'or colloïdal.

4) Finalement, nous déterminerons si MAP2b et MAP2c confèrent une certaine stabilité au réseau d'actine-F en traitant les cellules Sf9 exprimant une des isoformes avec la cytochalasine D, une drogue qui dépolymérise les filaments d'actine.

**Tau mediated process outgrowth is differentially altered by
the expression of MAP2b and MAP2c in Sf9 cells**

Mathieu Boucher, Annie Vallée, Clermont Beaulieu and Nicole Leclerc

Département de pathologie et biologie cellulaire and Centre de Recherche en Sciences
neurologiques, Université de Montréal, P.Q., Canada H3C 3J7

Short running title: Patterns of process outgrowth induced by co-expression of MAPs in
Sf9 cells

To whom correspondence should be addressed:

Nicole Leclerc
Département de pathologie et
biologie cellulaire
Université de Montréal
2900 Edouard-Montpetit
Montréal, P.Q.
Canada H3C 3J7
Telephone: (514)-343-5657
Fax: (514)-343-5755
E-mail: leclern@ere.umontreal.ca

SUMMARY

It is well documented that the MAPs, MAP2 and tau, play pivotal roles in neurite outgrowth (Caceres and Kosik, 1991; Caceres et al., 1992). Several isoforms of MAP2 and tau are co-expressed in neurons suggesting that the pattern of neurite outgrowth result from a functional equilibrium among these isoforms. In the present study, by co-expressing two of these MAPs at a time in Sf9 cells, we demonstrated that tau mediated process outgrowth is affected differently by MAP2b and MAP2c. MAP2b impairs tau ability to induce process outgrowth. On the other hand, tau affects MAP2c capacity to induce the formation of multiple processes. There is evidence that actin microfilaments (F-actin) are involved in the elaboration of tau-mediated process outgrowth in Sf9 cells (Knowles et al., 1994). By immunogold staining, we could show that MAP2b and MAP2c co-localize with both microtubules and F-actin in Sf9 cells. We investigated the effects of MAP2b and MAP2c on F-actin distribution and stability compared to that of tau in Sf9 cells. MAP2b and MAP2c could redistribute and stabilize F-actin in Sf9 cells. As previously reported for tau-expressing cells, the MAP2b-expressing cells developed a higher number of processes per cell and a higher number of cells presented processes in presence of cytochalasin (CD). However, the number of cells with multiple processes was lower in MAP2b-expressing cells than in tau-expressing cells treated with CD at 24 hs post-infection. This suggests that MAP2b exerts an effect on F-actin stability at an earlier stage of infection than tau. Collectively, our results suggest that the pattern of process outgrowth generated by the co-expression of these MAPs might result from functional competition among them to interact with both microtubules and F-actin.

Key words: Cytoskeleton, microtubule-associated proteins, microtubules, F-actin, baculovirus

INTRODUCTION

The elaboration of neurite outgrowth has been correlated to the expression of microtubule-associated proteins (MAPs) (Caceres and Kosik, 1991; Caceres, et al., 1992) MAPs have been shown to promote microtubule assembly and to stabilize microtubules (for review see (Hirokawa, 1994; Matus, 1994). There are basic differences in MAP composition between axons and dendrites: tau, a low molecular weight MAP, is highly enriched in axons while MAP2, a high molecular weight MAP is found in dendrites (Ludin and Matus, 1993). There is growing evidence that these MAPs contribute to different aspects of neurite outgrowth. In vitro, neurons develop a lamellipodial structure that consolidates into minor neurites (Banker and Goslin, 1990). Subsequently one of these minor neurites will elongate to become an axon whereas the remaining neurites will become dendrites. MAP2 seems to be involved in the consolidation of the lamellipodia in minor neurites whereas tau is involved in the elongation of the axonal process (Caceres and Kosik, 1991; Caceres, et al., 1992).

During neuronal differentiation, MAP2 function is accomplished by a diversity of isoforms of different sizes. These isoforms are generated by 1) alternative splicing and 2) post-translational modifications, in particular by phosphorylation. The juvenile form of MAP2 (termed MAP2c) consists of 467 amino acids and the mature MAP2 (MAP2b) consists of 1828 amino acids by the introduction of 1372 amino acids in the amino-terminus (Neve et al., 1986; Papandrikopoulou et al., 1989) . This splicing event shifts the apparent molecular weight of MAP2 from a ≈ 70 kDa juvenile form to a ≈ 280 kDa mature form. MAP2c is found both in growing dendrites and axons whereas MAP2b is found exclusively in dendrites (Tucker, 1990). Recently, new variants of the high molecular weight MAP2 have been identified. It was shown that MAP2a and MAP2b are generated by alternative splicing, MAP2b appearing before MAP2a (Chung et al., 1996). They also differ by their phosphorylation state (Ludin and Matus, 1993). Other high molecular weight MAP2 isoforms 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. Furthermore, a new low molecular weight MAP2, called MAP2d, has been identified that presents 4 imperfect repeats in the carboxyl-terminus whereas MAP2c has three repeats. In contrast to MAP2c, its expression is higher in adult brain and is preferentially found in glia (Ferhat et al., 1994b; Ferhat et al., 1996).

The temporal and spatial regulation of the expression of MAP2 isoforms might contribute to the complexity of cytoskeleton organization leading to neurite outgrowth.

The microtubules and microfilaments are highly coordinated during neurite outgrowth (Mitchison and Kirschner, 1988). The molecular interaction underlying such a tight coordination are still poorly characterized. We demonstrated that MAP2c might be involved in such interaction due to its ability to reorganize both actin microfilaments and microtubules. We have examined the ability of MAP2c and MAP2b to reorganize F-actin by microinjecting them in a human melanoma cell line, M2, which lacks actin-binding protein ABP-280 resulting in membrane blebbing (Cunningham et al., 1997). Microinjection of baculoviral purified MAP2c in this cell line stops membrane blebbing and induces the formation of actin-rich lamellae and production of process outgrowth. Microinjection of MAP2b also stops membrane blebbing but does not induce the formation of actin-rich lamellae and process outgrowth. The fact that MAP2c and MAP2b can stop membrane blebbing indicates that they interact with F-actin. However, the formation of actin rich lamellae by MAP2c and not by MAP2b is probably due to the fact that MAP2c can induce an isotropic gel of actin by cross-linking the actin filaments whereas MAP2b is unable to induce such a reorganization of F-actin (Cunningham, et al., 1997). The formation of such a gel by MAP2c may allow microtubules to extend through it, promoting process outgrowth.

We have demonstrated that individual expression of the MAP2 isoforms, MAP2c and MAP2b, and tau protein gives rise to distinct patterns of process outgrowth in Sf9 cells (Leclerc et al., 1996). MAP2c has the tendency to induce multiple processes whereas MAP2b induces one process. Tau-expressing cells usually develop one process (Knops et al., 1991). A morphometric analysis revealed that MAP2c-induced processes were thin and of uniform caliber and the ones of MAP2b were short, thick and taper. Tau-induced processes were thin, long and of uniform caliber. These morphometric discrepancies between MAP2c-, MAP2b-, and tau-induced processes were correlated to distinct organization of microtubules. For example, the process caliber was related to the spacing and the number of microtubules along the length of the process.

In neurons, these MAPs are co-expressed and co-localized at the early stage of neuronal differentiation (Ferreira et al., 1989). Therefore, the pattern of neurite outgrowth must result from a functional equilibrium between these MAPs. To better understand this equilibrium, we co-expressed them in Sf9 cells. In co-expression experiments, we showed that MAP2b could impair the ability of tau to initiate process outgrowth whereas its effect on MAP2c was less dramatic. On the other hand, expression of tau in MAP2c-expressing cells decreased the number of processes per cell compared to control MAP2c-expressing cells. From these data, one can conclude that

The microtubules and microfilaments are highly coordinated during neurite outgrowth (Mitchison and Kirschner, 1988). The molecular interaction underlying such a tight coordination are still poorly characterized. We demonstrated that MAP2c might be involved in such interaction due to its ability to reorganize both actin microfilaments and microtubules. We have examined the ability of MAP2c and MAP2b to reorganize F-actin by microinjecting them in a human melanoma cell line, M2, which lacks actin-binding protein ABP-280 resulting in membrane blebbing (Cunningham et al., 1997). Microinjection of baculoviral purified MAP2c in this cell line stops membrane blebbing and induces the formation of actin-rich lamellae and production of process outgrowth. Microinjection of MAP2b also stops membrane blebbing but does not induce the formation of actin-rich lamellae and process outgrowth. The fact that MAP2c and MAP2b can stop membrane blebbing indicates that they interact with F-actin. However, the formation of actin rich lamellae by MAP2c and not by MAP2b is probably due to the fact that MAP2c can induce an isotropic gel of actin by cross-linking the actin filaments whereas MAP2b is unable to induce such a reorganization of F-actin (Cunningham, et al., 1997). The formation of such a gel by MAP2c may allow microtubules to extend through it, promoting process outgrowth.

We have demonstrated that individual expression of the MAP2 isoforms, MAP2c and MAP2b, and tau protein gives rise to distinct patterns of process outgrowth in Sf9 cells (Leclerc et al., 1996). MAP2c has the tendency to induce multiple processes whereas MAP2b induces one process. Tau-expressing cells usually develop one process (Knops et al., 1991). A morphometric analysis revealed that MAP2c-induced processes were thin and of uniform caliber and the ones of MAP2b were short, thick and taper. Tau-induced processes were thin, long and of uniform caliber. These morphometric discrepancies between MAP2c-, MAP2b-, and tau-induced processes were correlated to distinct organization of microtubules. For example, the process caliber was related to the spacing and the number of microtubules along the length of the process.

In neurons, these MAPs are co-expressed and co-localized at the early stage of neuronal differentiation (Ferreira et al., 1989). Therefore, the pattern of neurite outgrowth must result from a functional equilibrium between these MAPs. To better understand this equilibrium, we co-expressed them in Sf9 cells. In co-expression experiments, we showed that MAP2b could impair the ability of tau to initiate process outgrowth whereas its effect on MAP2c was less dramatic. On the other hand, expression of tau in MAP2c-expressing cells decreased the number of processes per cell compared to control MAP2c-expressing cells. From these data, one can conclude that

these MAPs compete for a common factor that determines the number of processes per cell. Finally, we examined the reorganization of F-actin in MAP2c- and MAP2b-expressing cells since there is evidence that F-actin can modulate the pattern of process outgrowth in Sf9 cells (Knops, et al., 1991; Knowles, et al., 1994). By immunocytochemistry at the electron microscopic level, we demonstrated that MAP2b and MAP2c are found associated to microtubules and F-actin structures. Moreover, both MAP2b and MAP2c could reorganize and stabilize F-actin in Sf9 cells as previously reported for tau. Our results suggest that, the pattern of process outgrowth induced by co-expression of these MAPs might be determined by functional competition among them to interact with both microtubules and F-actin.

MATERIALS AND METHODS

Baculovirus production & cell culture

We used baculovirus containing the cDNA for either MAP2b, MAP2c (juvenile isoform of MAP2) or three repeat form of human Tau to infect insect ovarian Sf9 cells (Knops, et al., 1991; Leclerc, et al., 1996). The Sf9 cells were obtained from the American Type Culture Collection (ATCC #CRL 1711; Rockville, MD) and were used to propagate wild-type and recombinant baculoviruses. Sf9 cells were grown in Grace's medium (Gibco BRL, Burlington, Ontario, Canada) supplemented with 10% fetal bovine serum (Immunocorp, Montréal, Québec, Canada) as a monolayer at 27°C. For infection, cells were plated at a density of 2.0×10^6 cells/60 mm dishes. Cells were infected with viral stock at various multiplicity of infection (m.o.i.).

Immunofluorescence

For immunocytochemistry, the cells were fixed in 4% paraformaldehyde in phosphate-buffered saline (PBS) and .12M sucrose for 15 min. Then the cells were permeabilized with 0.3% Triton X-100 in PBS for 5 min. Mature MAP2 was revealed either by a monoclonal antibody (clone HM2) purchased from Sigma (Sigma, Mississauga, Ontario, Canada) diluted 1:200 or by a monoclonal antibody (clone AP-20) purchased from Boehringer Mannheim (Laval, Québec, Canada) diluted 1:400. MAP2c was revealed by the monoclonal antibody purchased from Sigma or with an anti-myc antibody diluted 1:100. Tau protein was revealed by the monoclonal antibody 46.1 diluted 1:20 (provided by Dr. Virginia Lee) or with the tau-1 antibody purchased from Boehringer Mannheim diluted 1:300. Primary antibodies were incubated overnight at 4°C or for 2 h at 37°C. We used the following secondary antibodies purchased from Jackson Immunoresearch Laboratories Inc.(Bio/Can, Mississauga, Ontario, Canada): the anti-mouse Fab fragment conjugated with Rhodamine (dilution 1:1000) and a donkey anti-mouse conjugated with FITC (dilution 1:1000). All these antibodies were diluted in PBS plus 5% BSA. Incubations were carried out at 37°C for one hour. After three washes in PBS, the cells were mounted in polyvinyl alcohol mounting media, and visualized by fluorescence microscopy.

Immunocytochemistry for electron microscopy

For immunogold, Sf9 cells were washed in PEM (80 mM Pipes, pH 6.8, 5 mM EGTA and 1 mM MgCl₂) and were extracted and fixed in 0.3% glutaraldehyde and 0.5% Nonidet P-40 in PEM for 15 min at room temperature. After fixation, the cells were

permeabilized with 0.2% Triton X-100 in TBS, pH 7.4, for 30 min and then reacted with 1 mg/mL NaBH₄ in TBS for 15 min. The cells were then incubated in 10% normal goat serum (NGS) in TBS for 30 min and were then incubated with a polyclonal antibody directed against MAP2 and a monoclonal antibody directed against tubulin. Cells were washed 3 times for 10 min in TBS and then incubated with 0.2 μ M phalloidin-biotin in PBS plus 1% BSA for 60 min and then washed 3 times for 10 min in TBS pH 7.4 and two times in TBS pH 8.2. The cells were incubated with streptavidin coupled to 5 nm gold (1:20) diluted in TBS pH 8.2 plus 1% BSA for 4 h at room temperature. After washing 3 times in TBS, pH 8.2, the cells were incubated with a 12 nm gold coupled anti-mouse antibody and 18 nm gold coupled anti-rabbit antibody in TBS pH 8.2 plus 1% BSA overnight at 4°C. After washing the cells 5 times in TBS, they were postfixed in 1% glutaraldehyde plus 0.2% tannic acid in 0.1 M cacodylate buffer, pH 7.4, for 30 min. The cells were washed 3 times in .1M cacodylate buffer and then post-fixed in 0.5% osmium tetroxide at 4°C for 10 min. The cells were washed in .1M cacodylate buffer 3 times for 10 min. Postfixed cells were stained in 1% uranyl acetate in 70% ETOH for 30 min, dehydrated and embedded in Epon.

Drug treatment

Cytochalasin D (ICN Pharmaceuticals Canada Ltd., Montréal, Canada) was prepared as a 1 mg/ml stock solution in DMSO (J.T. Baker, Phillisburg, NJ), diluted to a final concentration of 2 μ g/ml in culture media. The cells were fixed after 2 hours.

Morphological analysis

The morphological analysis was performed by two observers. To examine the effect of cytochalasin D on the pattern of process outgrowth, each observer counted two sets of 150 cells for every MAPs. In double-infection experiments, two observers counted 450 cells in 3 different sets of experiments for every condition.

Statistical analysis

Chi square tests were performed to analyse the data. A 5% level was considered for the statistical significance. However, in order to consider the multiplicity of test, we used a 0.5% level of significance, since the number of data for this test was considerably reduced.

RESULTS

Pattern of process outgrowth induced by co-expression of MAP2b/MAP2c, MAP2b/tau and MAP2c/tau in Sf9 cells

Sf9 cells were co-infected with MAP2b and MAP2c recombinant baculovirus. MAP2b virus m.o.i. was higher than that of MAP2c virus since at identical m.o.i., MAP2b expression is lower than that of MAP2c (Leclerc, et al., 1996). At 60 h post-infection, cells were fixed and double-labelled for MAP2c and MAP2b by using an antibody specific to MAP2b (AP-20, Boehringer Mannheim) and an anti-myc antibody to recognize MAP2c since a myc tag is fused to MAP2c sequence (Leclerc, et al., 1996). Both MAP2 isoforms were present in the cell body and the processes (Figure 1). Two morphological parameters were quantitatively analyzed: the number of processes per cell and the number of cells with and without processes (Figure 2). At low MAP2c m.o.i., the MAP2b/MAP2c-expressing cells had the tendency to develop one process as noted in single MAP2b infection (Figure 2). At MAP2b/MAP2c viral m.o.i. of 8/0.5 and 8/1, 51% and 45% of the cells presented one process compared to only 27% of the MAP2c-expressing cells as previously reported (Leclerc, et al., 1996). If the m.o.i. of MAP2c was increased, there was a higher number of cells with multiple processes. At MAP2b/MAP2c viral m.o.i. of 8/0.5 and 6/2, 24% and 34%, respectively, presented multiple processes whereas 56% of the MAP2c-expressing cells developed multiple process as documented elsewhere (Leclerc, et al., 1996). Consistently, if MAP2c virus m.o.i was higher than that of MAP2b, the cells presented multiple processes as noted in MAP2c single infection. This is not surprising since MAP2c expression is considerably higher than the one of MAP2b (Leclerc, et al., 1996). A small increase of MAP2c virus m.o.i. had an important effect on the number of cell with processes. In single MAP2b infection, only 20% of the cells have processes whereas at MAP2b/MAP2c viral m.o.i. of 8/0.5 and 8/1, 43% and 68% of cells had processes. However, there was no significant difference between 8/1 (62%) and 6/2 (68%). From the above observations, it appears that MAP2c is able to exert an effect in MAP2b-expressing cells to induce process outgrowth. Nonetheless, the number of processes per cell is lower in MAP2b/MAP2c-expressing cells than in MAP2c-expressing cells.

We then co-infected MAP2b and tau protein to verify whether MAP2b could affect other MAPs ability to induce process outgrowth in Sf9 cells. The expression of MAP2b and tau protein was monitored by immunocytochemistry. Both MAP2b and tau were found in the cell body and processes (Figure 1). The variation of MAP2b and tau

m.o.i. did not have any significant effect on the number of process per cell. As observed in MAP2b and tau single infection, approximately 70% of the cells developed one process (Figure 2). Interestingly, the number of cells without processes was higher than the one with processes as noted in MAP2b single infection. However, an increase in tau m.o.i. and a decrease in MAP2b m.o.i. resulted in an increase of the number of cells with processes. For example, at MAP2b/tau viral m.o.i. of 8/1, ~19% of the cells presented processes whereas at m.o.i. of 2/6, 34% of the cells had processes. Nonetheless, the percentage of cell with processes in MAP2b/tau-expressing cells is lower than that of tau-expressing cells approximately 80%. Based on this observation, MAP2b seems to impair the effect of tau on initiation of process outgrowth.

We carried out co-infection with MAP2c and tau to verify whether MAP2c would also overcome dramatically tau effects on process outgrowth as did MAP2b. This would result in a higher number of cells with multiple processes rather than one process as observed in tau single infection (Knops, et al., 1991). Both MAP2c and tau are found in the cell body and along the processes (Figure 1). In MAP2c/tau-expressing cells, an increase of tau m.o.i. induced an increase of the number of cells with one process (Figure 2). Similarly, an increase of MAP2c m.o.i. was correlated with an increase of the number of cells with multiple processes. At MAP2c/tau viral m.o.i. of 8/1 and 1/8, 31% and 18% of the cells had multiple processes. Thus, at very low m.o.i., tau influences MAP2c phenotype since the percentage of cells presenting multiple processes is lower (31%) than the one of MAP2c-expressing cells (~60%). This tendency becomes more important as tau m.o.i. increases. Moreover, the number of cells presenting two processes in any MAP2c/tau co-infection condition was higher than in tau or MAP2c single infection. In summary, the expression of MAP2b impairs tau ability to induce process outgrowth and to a lesser extent that of MAP2c. On the other hand, tau decreased the capacity MAP2c to induce multiple processes.

MAP2b and MAP2c can redistribute actin microfilaments in Sf9 cells

Formation of microtubules is not sufficient to induce process outgrowth in Sf9 cells given the low percentage of MAP2b-expressing cells with processes. Therefore, an additional element is involved in the production of processes by Sf9 cells during the expression of these MAP2 isoforms. There is some pieces of evidence pointing out the role of actin microfilaments in process formation in Sf9 cells (Knops, et al., 1991; Knowles, et al., 1994). We thus investigated the distribution of actin filaments in MAP2c- and MAP2b-expressing cells by using rhodamine-phalloidin. At 48 h post-infection, since most of the MAP2c and MAP2b-expressing cells

demonstrated microtubule assembly, we examined the distribution of F-actin in relation to that of microtubules (Figure 3). In MAP2c-expressing cells with multiple processes, the microtubules emerged radially and tangentially from the cell surface as described elsewhere (Leclerc, et al., 1996). F-actin staining was concentrated at the sites of emergence of processes. In MAP2c-expressing cells developing one or two processes, the shaft of the processes contained mainly microtubules, as revealed by tubulin staining, and the tip of the process was intensely stained with rhodamine phalloidin indicating that it was mainly composed of F-actin as previously reported for tau-induced processes (Baas et al., 1991). In MAP2b-expressing cells with processes, microtubules originated in the cell body and joined in the hillock region to form a thick bundle. F-actin was found at the plasma membrane, in the cytoplasm and along the process. Occasionally, F-actin was concentrated at the tip of the process (data not shown). In cells without processes, microtubules were distributed in rings under the plasma membrane and small F-actin aggregates were noted at the plasma membrane and in the cytoplasm.

Co-localization of MAP2c and MAP2b with F-actin by immunogold electron microscopy

To further examine the interaction of MAP2c and MAP2b with F-actin, we investigated the subcellular localization of MAP2c and MAP2b in Sf9 cells. By using an immunogold method, we demonstrated that MAP2c and MAP2b co-localize both with F-actin and microtubules at any time of infection (Figure 4). To make sure that the MAP2 staining observed in F-actin positive structures was not associated to soluble tubulin precipitated on F-actin during the extraction procedure, the cells were triple stained with an anti-tubulin antibody, with biotinylated-phalloidin to reveal F-actin and with a polyclonal antibody directed against MAP2. In wild-type-, MAP2c- and MAP2b-infected cells, no tubulin staining was noted in F-actin structures (Figure 4A, C, E). Tubulin staining was exclusively found on microtubules. In MAP2c- (Figure 4C,D) and MAP2b- expressing cells (Figure 4E, F), MAP2 staining was found in F-actin structures as well as on microtubules. This confirms that MAP2c and MAP2b are associated with F-actin structures in Sf9 cells.

MAP2b and MAP2c block the depolymerizing effect of cytochalasin D on F-actin in Sf9 cells

In previous work, it was demonstrated that tau protein confers stability to F-actin in Sf9 cells by blocking the depolymerizing effect of cytochalasin D (CD) on F-actin

(Knowles, et al., 1994). The cells infected with wild-type virus and treated with CD at 24 and 48 h post-infection developed multiple processes whereas nontreated cells were round (Figure 5). As previously reported, Tau-expressing cells develop one process but in presence of CD, they present multiple processes after 24 h post-infection as noted in wild-type infected cells (Figure 5). However, at 72 h post-infection, both the nontreated and the CD treated cells expressing tau present one process indicating that tau protects F-actin against CD (Figure 5). Number of processes per cell was quantitated in nontreated and treated cells at 24 and 48 h post-infection (Figure 6). In nontreated cells, at any time of infection, approximately 76% and 9% of the tau-expressing cells have one process and multiple processes respectively. Following treatment with CD at 24 h post-infection, 13% and 47% of tau-expressing cells had one and multiple processes respectively. In contrast, at 48 h post-infection, 56% had one process and 10% had multiple processes. We then tested the resistance of F-actin to CD in MAP2c- and MAP2b-expressing Sf9 cells. The MAP2c-expressing cells treated with CD at 24 h post-infection present multiple processes as do the nontreated cells (Figure 5). However, the processes developed by CD treated cells appear longer and have filopodial-like structures. A greater number of cells had processes. The MAP2c-expressing cells treated with CD at 48 h post-infection, seem to have a slightly higher number of processes per cell than nontreated cells but in contrast to cells treated with CD at 24 h post-infection, no filopodial-like structures are observed (Figure 5). The percentage of cells presenting multiple processes in presence of CD at 24 h and 48 h post-infection did not differ from that of nontreated cells. At 24 h post-infection, 69% of the CD treated cells had multiple processes compared to 65% of control cells and at 48 h post-infection, 62% of the CD treated cells presented multiple processes compared to 65% of control cells (Figure 6). The MAP2b-expressing cells treated with CD at 24 h post-infection developed one main process and several thin processes (Figure 5). Often, the main process presented filopodia or spikes. Most of the CD treated cells had processes whereas most of the nontreated cells had none (Leclerc, et al., 1996). Interestingly, the percentage of MAP2b-expressing cells treated with CD and presenting one process (36%) is higher than that of tau-expressing cells (13%) at 24 h post-infection. The MAP2b-expressing cells treated with CD at 48 h post-infection developed one or two processes presenting no filopodial-like structures (Figure 5). 43% of the cells treated with CD presented multiple processes at 24h post-infection whereas at 48 h post-infection, only 9% had multiple processes (Figure 6). There was a higher number of cells presenting processes as noted at 24 h post-infection. Similar results were obtained after 72 h post-infection (data not shown). In summary, at later

time of infection, CD treatment induces a lower number of processes in MAP2b-expressing cells whereas in MAP2c-expressing cells, it generates no change or a slight increase of number of processes per cell. However, formation of filopodial-like structures was completely eliminated in both MAP2c and MAP2b-expressing cells at later time of infection. Given the above, it appears that MAP2b and MAP2c protect F-actin against CD in Sf9 cells as reported for tau protein (Knowles, et al., 1994). Moreover, it appears that MAP2b protects F-actin against CD at the very early stage of infection since the percentage of MAP2b treated cells with CD presenting one process is higher than that of tau at 24 h post-infection.

DISCUSSION

The present results demonstrate that the pattern of process outgrowth is influenced by the ratio of MAP expression in Sf9 cells. In co-expression experiments, MAP2c could assist MAP2b to induce process outgrowth. The number of process per cell was greater when MAP2b/MAP2c ratio was low and was lower when MAP2b/MAP2c ratio was high. On the other hand, MAP2b importantly impairs tau capacity to induce process outgrowth. A high MAP2b/tau ratio induced a low number of cells with processes and a low ratio resulted in an increase of the number of cells with processes although the percentage of cells with processes was lower than in tau-expressing cells. In contrast, in MAP2c/tau-expressing cells, tau negatively affected the capacity of MAP2c to induce multiple processes. Indeed, a high MAP2c/tau ratio resulted in a lower number of cells with multiple processes than in MAP2c-expressing cells. Furthermore, we demonstrated that both MAP2b and MAP2c could redistribute and stabilize F-actin in Sf9 cells as previously reported for tau. Therefore, in co-expression experiments, these MAPs could compete to interact with both microtubules and microfilaments.

The pattern of process outgrowth varies as a function of MAP2b/MAP2c, MAP2b/tau and MAP2c/tau ratio in Sf9 cells

A slight variation of MAP2b/MAP2c ratio induces an alteration of the pattern of process outgrowth in Sf9 cells. A decrease of MAP2b/MAP2c ratio results in a higher number of cells with processes compared to MAP2b single infection. On the other hand, the number of processes per cell is lower than in MAP2c single infection. The opposite effects are noted when the MAP2b/MAP2c ratio is increased. Therefore, the final pattern of process outgrowth results from a functional equilibrium between MAP2c and MAP2b in Sf9 cells. Given the above, MAP2b/MAP2c ratio might vary in different population of neurons and thereby contributes to their distinct morphology. In myoblasts, the relative level of expression of β - and γ -actin influences their morphology. An elevated expression of β -actin results in an increase of cell surface area and cell thickness whereas an increase of γ -actin induces the opposite effects (Schevzov et al., 1992). Interestingly, the morphological phenotype induced by a high β -/ γ -actin ratio varies from one cell type to the other suggesting that the cellular context influences β - and γ -actin function within cells. For example, both L mouse cells and human erythrocytes present a high β -/ γ -actin ratio but their morphology and organization of F-actin is different (Bennett, 1985; Otey et al., 1986).

The results presented here illustrate the high capacity of MAP2c to induce process outgrowth in contrast to the low capacity of MAP2b in Sf9 cells. MAP2c is consistently expressed during the early stage of neuronal differentiation when neurite outgrowth occurs (Tucker, 1990). However, the role of MAP2c in neurite outgrowth is not clearly defined. In adult brain, MAP2c expression is usually found in regions such as the olfactory bulb and in the retina where the morphology of neurons is dynamic (Tucker and Matus, 1988; Viereck et al., 1989). However, in adult transgenic mice overexpressing MAP2c, no neurite outgrowth or morphological alteration is observed in brain areas where MAP2c is not usually expressed (Marsden et al., 1996). The fact that MAP2c expression in adult brain does not induce any morphological changes indicates that the MAP2b/MAP2c protein ratio is not the only factor that controls the function of MAP2c and MAP2b in neurons. In vitro, it has been demonstrated that MAP2 phosphorylation changes its affinity to bind to microtubules and actin microfilaments (Selden and Pollard, 1983; Drewens et al., 1997). The phosphorylation of MAP2b and MAP2c varies during neuronal differentiation (Sanchez et al., 1995). Interestingly, the neuronal activity can modulate MAP2b phosphorylation in adult brain. For example, in rat olfactory bulb, the blockage of odorant passage induces a decrease of MAP2 phosphorylation (Philpot et al., 1997). Glutamatergic receptors induce both phosphorylation and dephosphorylation of MAP2 (Halpain and Greengard, 1990; Quinlan and Halpain, 1996b). Therefore, modifications of MAP2 phosphorylation might induce a reorganization of the cytoskeleton which could in turn result in alterations of dendritic morphology. Indeed, it was shown that dendritic axonal branching is modulated by protein phosphorylation in cultured rat hippocampal neurons (Audesirk et al., 1997). It is known that phosphorylation occurs in Sf9 cells (Cheley et al., 1992). Thus, the phosphorylation state of MAP2b might alter its ability to promote process outgrowth whereas the one of MAP2c favors it in Sf9 cells. Therefore, both the level of expression and the phosphorylation state of MAP2c and MAP2b might control their function within cells.

MAP2b and MAP2c differentially affect tau mediated process outgrowth in Sf9 cells. Our observations suggest that there is a functional competition between MAP2c and tau given that at low m.o.i., they could influence each other pattern of process outgrowth in Sf9 cells. In MAP2c/tau-expressing cells, there is a decrease of the number of cells with multiple processes when the ratio is decreased and an increase of number of cells with multiple processes when the ratio is increased. This suggests that tau and MAP2c might compete for a same factor that influences the number of processes per cell. Under MAP2c influence, this factor gives rise to multiple processes and under

the one of tau, it induces one process. Another possibility is that the interacting site of each of these MAPs with this factor is hindered by the binding of each other. The effects of MAP2b on tau mediated process outgrowth are more dramatic than the ones on MAP2c. Indeed, at any MAP2b/tau ratio, MAP2b blocks almost completely tau's capacity to initiate process outgrowth. It was shown that tau has to interact with the plasma membrane to induce process outgrowth in PC12 cells (Brandt et al., 1995). Similar interaction might be involved in the induction of process outgrowth by tau protein in Sf9 cells and therefore MAP2b could prevent this interaction.

During neuronal differentiation, MAP2b and tau are segregated in different cellular compartments whereas MAP2c and tau are present in the same compartment (Tucker, 1990). The present results suggest that MAP2b could restrain tau ability to initiate neurite outgrowth. This could contribute to their segregation in different neuronal compartments and consequently to the establishment of neuronal polarity. Tau seems to limit MAP2c ability to generate multiple processes. This functional competition between tau and MAP2c might participate in the transition from minor neurites to the elaboration of a single axonal process. Indeed, no axonal differentiation occurs when the expression of tau is suppressed in primary neuronal culture (Caceres and Kosik, 1991). On the other hand, MAP2 suppression prevents the formation of minor neurites (Caceres, et al., 1992).

MAP2b and MAP2c reorganize and stabilize F-actin in Sf9 cells

We showed by immunocytochemistry at the electron microscopic level that MAP2b and MAP2c co-localize with F-actin structures in Sf9 cells. While it is not possible to determine whether MAP2 isoforms interact directly with F-actin or via an actin-binding protein, it indicates that MAP2 isoforms could contribute to organize F-actin in Sf9 cells. In fact, there is growing evidence that MAP2 isoforms influence the distribution of F-actin within cells. MAP2c and MAP2b could reorganize F-actin in a human melanoma cell line, M2, which lacks actin-binding protein ABP-280 resulting in membrane blebbing (Cunningham, et al., 1997). MAP2c could stop membrane blebbing and induces the formation of actin-rich lamellae and production of process outgrowth whereas MAP2b only stopped membrane blebbing but did not induce the formation of actin-rich lamellae and process outgrowth. Another study demonstrated that MAP2c and MAP2d can reorganize F-actin in HEK cells (Ferhat, et al., 1996). Here, we showed that MAP2c and MAP2b redistribute F-actin in Sf9 cells. In both MAP2b- and MAP2c-expressing Sf9 cells, the organization of F-actin into bundles is not as apparent as in MAP2c and MAP2d transfected HEK cells (Ferhat, et al., 1996). In Sf9 cells, the

distribution of F-actin is correlated to different pattern of process outgrowth. In MAP2c-expressing Sf9 cells that present multiple processes, F-actin is concentrated at the site of emergence of the processes in the cell body. In MAP2c-expressing Sf9 cells with one or two processes, F-actin is concentrated at the tips of the processes. This distribution is reminiscent of the one observed in MAP2d transfected HEK cells where F-actin is concentrated in spiny protrusions emanating from the cell body and at the tips of wide extensions (Ferhat, et al., 1996). Finally, in MAP2b-expressing Sf9 cells, the distribution of F-actin is rather uniform in the cell body and along the process. Therefore, MAP2b and MAP2c exert distinct effects on F-actin organization in Sf9 cells as noted for MAP2c and MAP2d in HEK cells. Interestingly, in HEK cells, MAP2c and MAP2d confer a similar organization to F-actin and microtubules thereby both of these elements are organized in thicker and tighter bundles in MAP2c transfected cells than in MAP2d cells (Ferhat, et al., 1996). In Sf9 cells, similar observations could not be made since the organization of F-actin into bundles is not apparent. The fact that expression of MAP2c in Sf9 cells does not result in an organization of F-actin into bundles might be explained by the fact that organization of F-actin into bundles require the presence of other actin-binding proteins which are not present or not active in Sf9 cells. Collectively, these results demonstrate that MAP2 isoforms are able to reorganize both microtubules and F-actin within cells.

Several studies have shown that MAP2 modifies the biophysical properties of F-actin *in vitro* (Sattilaro et al., 1981; Selden and Pollard, 1983; Sattilaro, 1986; Yamauchi and Fujisawa, 1988; Correas et al., 1990). Recent studies demonstrated that the concentration of MAP2c can modulate its effects on F-actin. *In vitro*, at low concentration, MAP2c induces an isotropic gel of F-actin whereas at high concentration, it induces bundling of F-actin (Cunningham, et al., 1997). The different patterns of process outgrowth induced by MAP2c and different redistribution of F-actin might be explained by the fact that MAP2c concentration varies among MAP2c-expressing cells. Since tau protein, which bundles F-actin, induces the elaboration of a single process in Sf9 cells, in MAP2c-expressing cells developing one or two processes, the bundling activity of MAP2c would predominate (Cunningham, et al., 1997). In tau-expressing cells, F-actin is concentrated at the tip of the process as reported here in MAP2c-expressing cells with one or two processes (Knowles, et al., 1994). On the other hand, in MAP2c-expressing cells presenting multiple processes, F-actin would preferentially be organized in an isotropic gel. Interestingly, it was demonstrated that the ability of MAP2c to induce an isotropic gel of F-actin was not shared by MAP2b and tau protein (Cunningham, et al., 1997). The formation of such a gel by MAP2c may allow

microtubules to extend through it, and induce the formation and elongation of processes. This could explain the higher tendency of MAP2c than MAP2b and tau to induce multiple processes. Given the above, one can conclude that MAP2c and MAP2b exert distinct effects on F-actin organization and this influences the production of process outgrowth.

We showed that MAP2c and MAP2b confer stability to F-actin in Sf9 cells. However, microinjection of baculoviral purified MAP2c in a melanoma cell line that does not express the actin-binding protein, ABP-280, stops membrane blebbing by the formation of actin-rich lamellae but does not protect F-actin against CD (Cunningham, et al., 1997). Similarly, in HEK cells, MAP2c does not stabilize F-actin but MAP2d does (Ferhat, et al., 1996). These discrepancies of MAP2c effects on F-actin stabilization might be explained by the level of expression of MAP2c which is highest in Sf9 cells (Leclerc, et al., 1996). Moreover, it was shown that the phosphorylation state of MAP2b affects its binding affinity to F-actin (Selden and Pollard, 1983; Yamauchi and Fujisawa, 1988). MAP2 phosphorylation occurs in Sf9 cells as revealed by the anti-MAP2 phosphoepitope-specific antibody, AP18 (Berling et al., 1994; Leclerc, et al., 1996). Thus, MAP2 phosphorylation state might vary from one cell type to the other and consequently affects MAP2 effects on F-actin.

Previous studies demonstrated that the carboxy terminus of MAP2 contains an actin-binding site corresponding to the second repeated tubulin-binding motif (Correas, et al., 1990). Moreover, since MAP2d but not MAP2c confers stability to F-actin in HEK cells, it indicates that the additional sequence in the C-terminus of MAP2d is involved in the stabilization of F-actin (Ferhat, et al., 1996). A second actin-binding site might be present in the amino-terminus (Sattilaro, et al., 1981). The insertion of the additional sequence of 1372 amino acids in the N-terminal of MAP2b appears to alter the interaction with actin microfilaments given that baculoviral purified MAP2c and MAP2b present different capacities to reorganize F-actin *in vitro* (Cunningham, et al., 1997). It was shown for ezrin, a cytoskeletal linker interacting with actin microfilaments and microtubules, that the N-terminal modulates the actin binding activity of the COOH-terminal. Ezrin overexpression in Sf9 cells does not induce process outgrowth. However, the expression of its COOH-domain induces process outgrowth in Sf9 cells (Martin M et al., 1995). This effect is completely abolished by co-expression of its N-terminal. Another possibility is that the additional sequence of MAP2b N-terminal might contain phosphorylation sites that modulates the actin binding activity of MAP2. Indeed, the phosphorylation state of MAP2 modulates its interaction with F-actin (Selden and Pollard, 1983; Yamauchi and Fujisawa, 1988).

MAP2b-expressing SF9 cells treated with CD present a higher number of processes per cell than the control cells and a higher number of cells with processes. These changes are similar to that observed when MAP2c is co-expressed with MAP2b in Sf9 cells. Therefore, it is most likely that MAP2c acts on F-actin in presence of MAP2b. Since the number of processes is lower than in MAP2c-expressing cells, it indicates that MAP2b modifies the capacity of MAP2c to reorganize F-actin. This could be due to the early stabilizing effect of MAP2b on F-actin during the infection. MAP2b alters considerably the ability of tau to initiate process outgrowth. As previously reported, tau-induced process outgrowth involves a reorganization of F-actin (Knowles, et al., 1994). Therefore, MAP2b could prevent tau from interacting with F-actin. This might imply that MAP2b and tau compete for a same F-actin binding site.

Both F-actin and microtubule cytoskeletons are tightly regulated by signalling proteins such as the small GTPases (Machesky and Hall, 1996; Cook et al., 1998). Moreover, recent studies demonstrated that the small GTPases are involved in dendritic morphology (Threadgill et al., 1997). Therefore, the interaction of MAP2c, MAP2b and tau with the actin and microtubule cytoskeletons could be regulated by these molecules during axonal and dendritic differentiation. Further studies are needed to examine the association of these MAPs with the cytoskeleton during inhibition and activation of these GTPases.

ACKNOWLEDGMENTS

We thank Gaston Lambert for the photographic work. This work was supported by Medical Research Council of Canada grant (MT-13245) to NL and by Fonds de la recherche en santé du Québec grant to NL.

BIBLIOGRAPHY

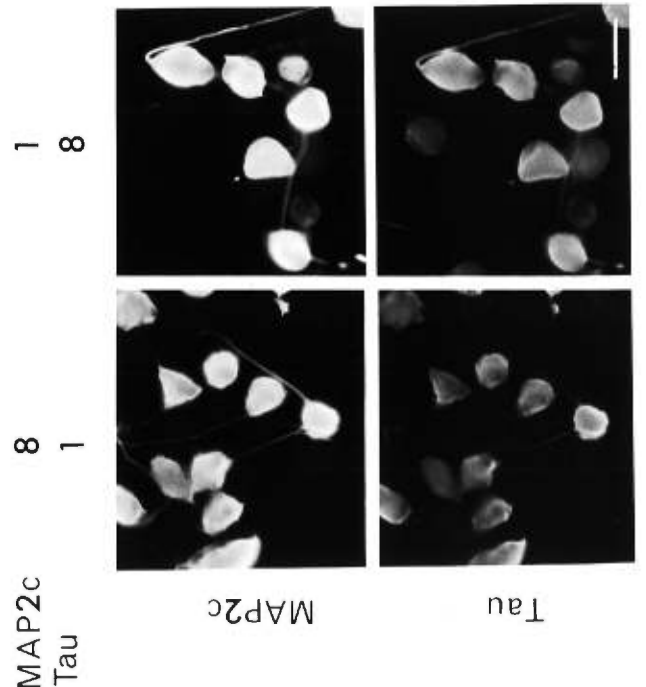
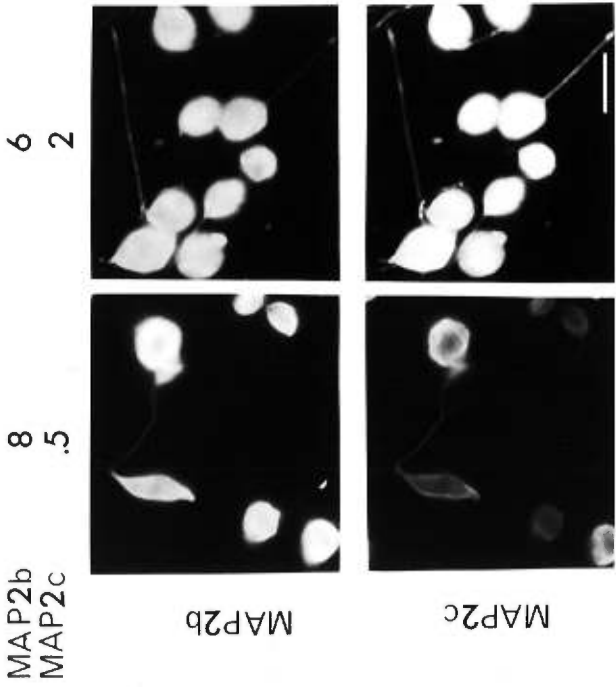
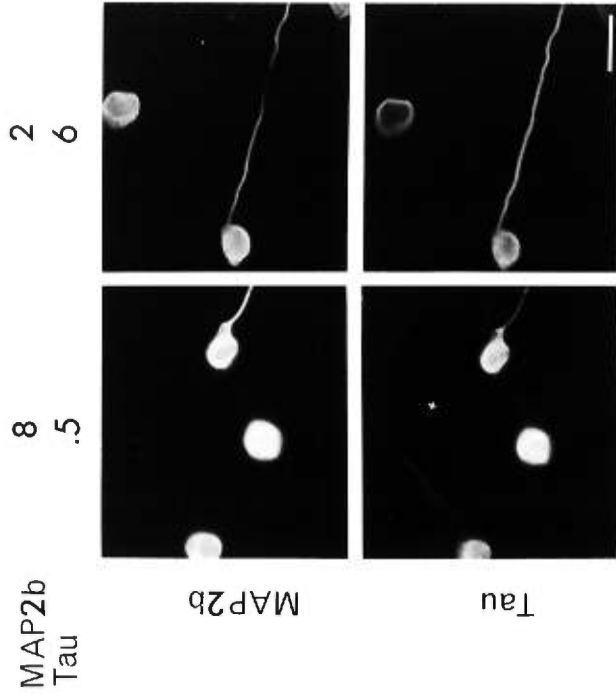
- Audesirk, G., Cabell, L. and Kern, M. (1997) Modulation of neurite branching by protein phosphorylation in cultured rat hippocampal neurons. *Brain Res. Develop. Brain Res.* 102:247-60.
- Baas, P.W., Pienkowski, T.P. and Kosik, K.S. (1991) Processes induced by tau expression in Sf9 cells have an axon-like microtubule organization. *J. Cell Biol.* 115:1333-1344.
- Banker, G. and Goslin, K. (1990) *Culturing Nerve Cells*. Cambridge, Massachusetts:
- Bennett, V. (1985) The membrane skeleton of human erythrocytes and its implications for more complex cells. *Annu. Rev. Biochem.* 54:273-304.
- Berling, B., Wille, H., Roll, B., Mandelkow, E.-M., Garner, C. and Mandelkow, E. (1994) Phosphorylation of microtubule-associated proteins MAP2a,b and MAP2c at Ser136 by proline-directed kinases in vivo and in vitro. *Eur. J. Cell Biol.* 64:120-130.
- Brandt, R., Léger, J. and Lee G (1995) Interaction of tau with the neural plasma membrane mediated by tau's amino-terminal projection domain. *J. Cell Biol.* 131:1327-1340.
- Caceres, A. and Kosik, K.S. (1991) Inhibition of neurite polarity by tau antisense oligonucleotides in primary cerebellar neurons. *Nature* 343:461-463.
- Caceres, A., Mautino, J. and Kosik, K.S. (1992) Suppression of MAP2 in cultured cerebellar macroneurons inhibits minor neurite formation. *Neuron* 9:607-618.
- Cheley, S., Kosik, K., Paskevich, P., Bakalis, S. and Bayley, H. (1992) Phosphorylated baculovirus p10 is a heat-stable microtubule-associated protein associated with process formation in Sf9 cells. *J. Cell Sci.* 102:739-752.

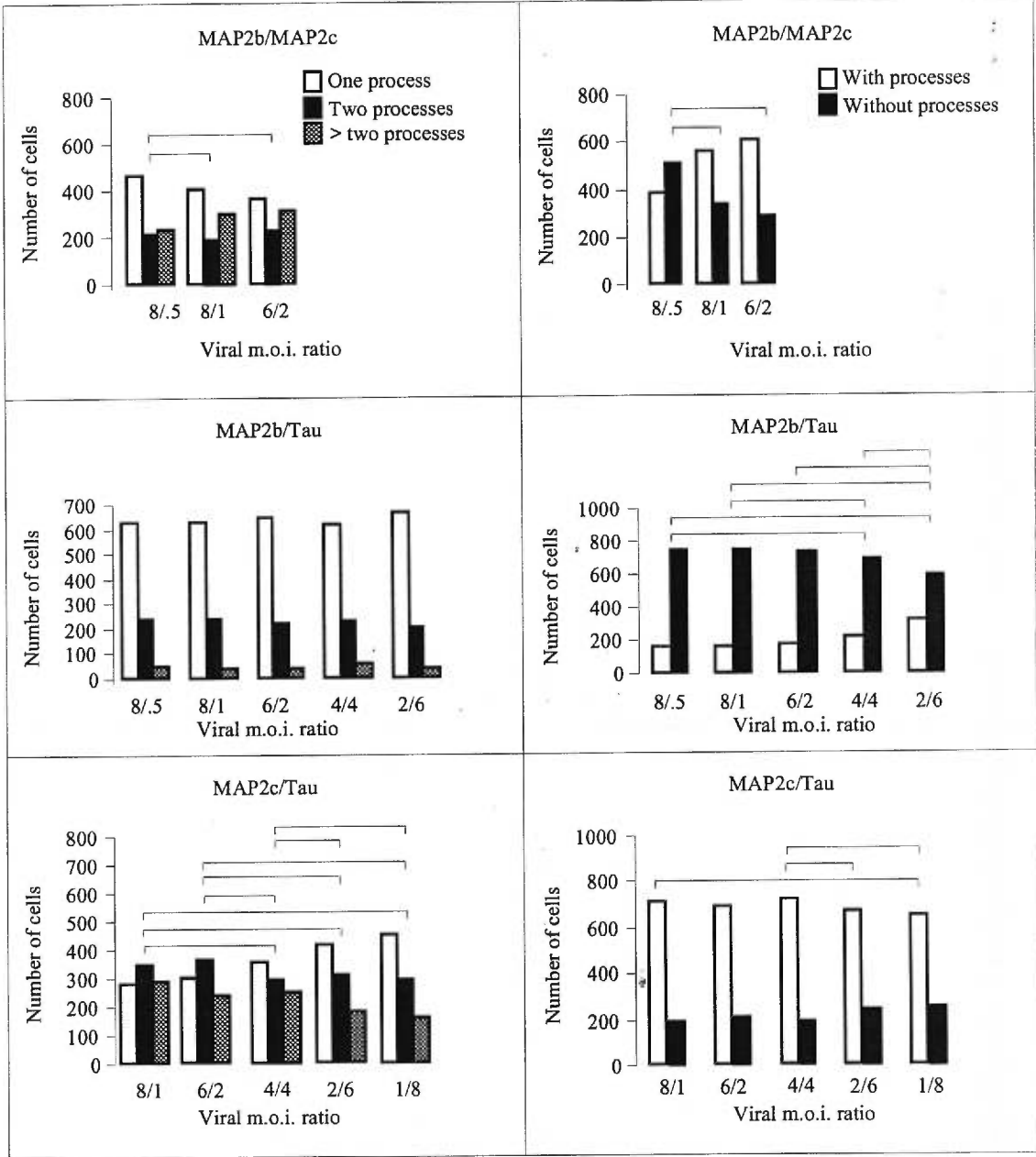
- Chung, W.J., Kindler, S., Seidenbecher, C. and Garner, C.C. (1996) MAP2a, an alternatively spliced variant of microtubule-associated protein 2. *J. Neurochem.* 66:1273-81.
- Cook, T., Nagasaki, T. and Gundersen, G. (1998) Rho guanosine triphosphatase mediates the selective stabilization of microtubules induced by lysophosphatidic acid. *J. Cell Biol.* 141:175-185.
- Correas, I., Padilla, 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.
- Couchie, D., Chabas, S., Mavilia, C. and 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. 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. *J. Cell Biol.* 136:845-857.
- Drewens, G., Ebner, A., Preuss, U., Mandelkow, E.-M. and Mandelkow, E. (1997) MARK, a novel family of protein kinases that phosphorylate microtubule-associated proteins and trigger microtubule disruption. *Cell* 89:297-308.
- Ferhat, L., Ben-Ari, Y. and Khrestchatisky, M. (1994b) Complete sequence of rat MAP2d, a novel MAP2d isoform. *C.R. Acad.Sci. Paris* 317:304-309.
- Ferhat, L., Represa, A., Bernard, A., Ben-Ari, Y. and Khrestchatisky, M. (1996) MAP2d promotes bundling and stabilization of both microtubules and microfilaments. *J. 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 the involvement of the microtubule-associated proteins, MAP-1a, HMW-MAP2, tau. *Dev. Brain Res.* 49:213-228.

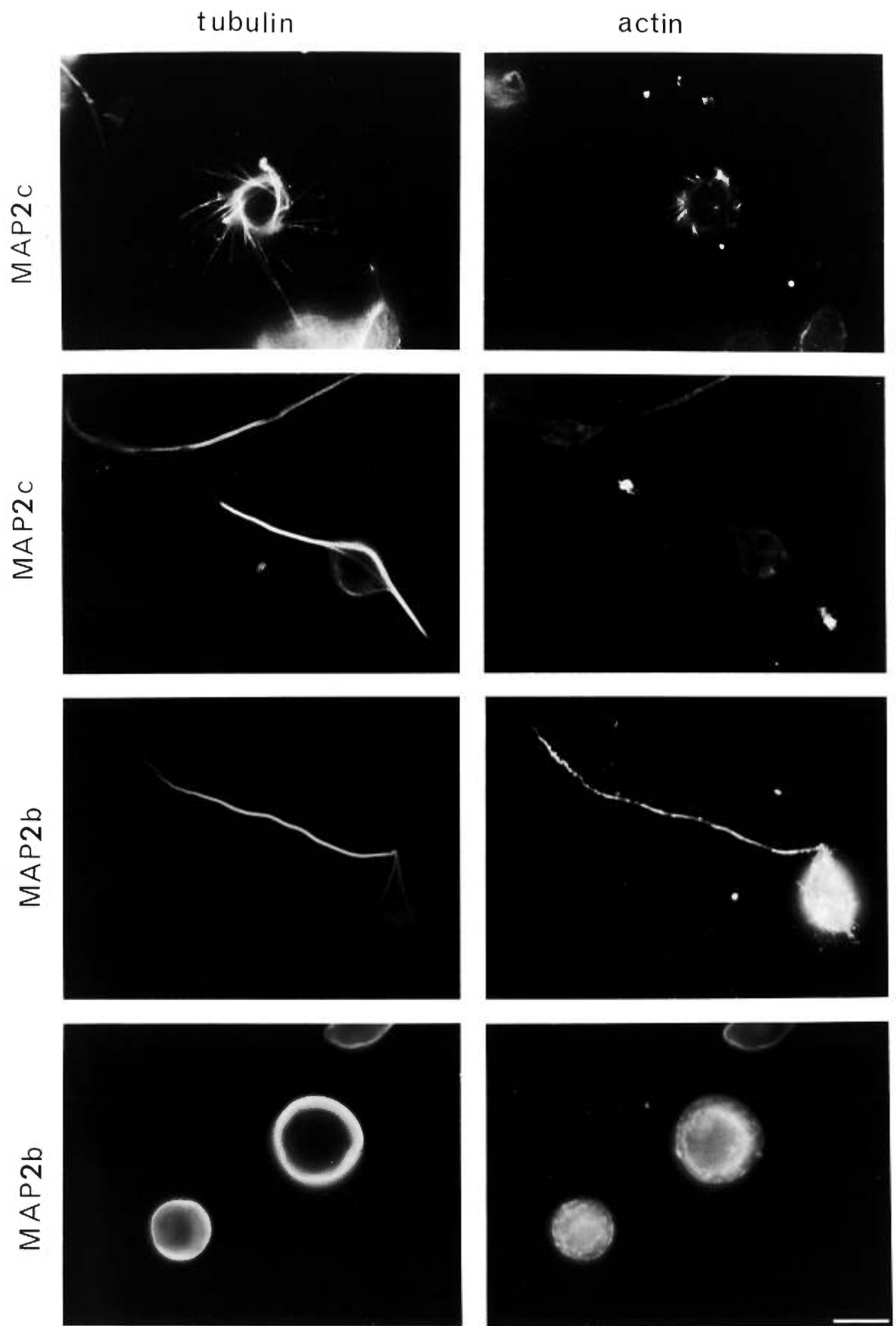
- Forleo, P., Couchie, D., Chabas, S. and Nunez, J. (1996) Four repeat high-mol-wt MAP2 forms in the rat dorsal root ganglia. *J. Mol. Neurosci.* 7:193-201.
- Halpain, S. and Greengard, P. (1990) Activation of NMDA receptors induces rapid dephosphorylation of the cytoskeletal protein MAP2. *Neuron* 5:237-246.
- Hirokawa, N. (1994) Microtubule organization and dynamics dependent on microtubule-associated proteins. *Curr. Opin. Cell Biol.* 6:74-81.
- Kalcheva, M., Weidenheim, K.M., Krees, Y. and 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.
- Knops, J., Kosik, K.S., Pardee, J.D., Cohen-Gould, L. and McConlogue, L. (1991) Overexpression of tau in a nonneuronal cell induces long cellular processes. *J. Cell Biol.* 114:725-733.
- Knowles, R., Leclerc, N. and Kosik, K.S. (1994) Organization of actin and microtubules during process formation in tau-expressing Sf9 cells. *Cell Motil. Cyto.* 28:256-264.
- Leclerc, N., Baas, P.W., Garner, G. and Kosik, K.S. (1996) Juvenile and mature MAP2 isoforms induce distinct cellular morphologies. *Mol. Biol. Cell* 7:443-455.
- Ludin, B. and Matus, A. (1993) The neuronal cytoskeleton and its role in axonal and dendritic plasticity. *Hippocampus* 3:61-72.
- Machesky, L. and Hall, A. (1996) Rho: a connection between the membrane receptor signalling and the cytoskeleton. *Trends Cell Biol.* 6:304-315.
- Marsden, K., Doll, T., Ferralli, J., Botteri, F. and Matus, A. (1996) Transgenic expression of embryonic MAP2 in adult mouse brain: Implications for neuronal polarization. *J. Neurosci.* 16:3265-3273.

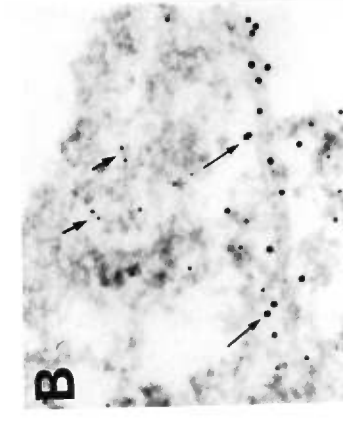
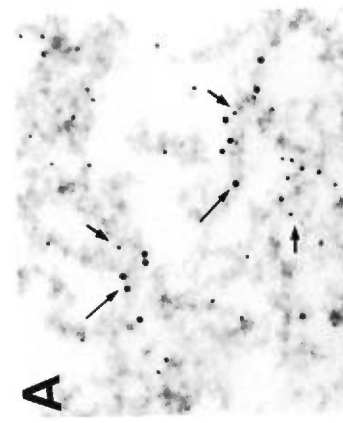
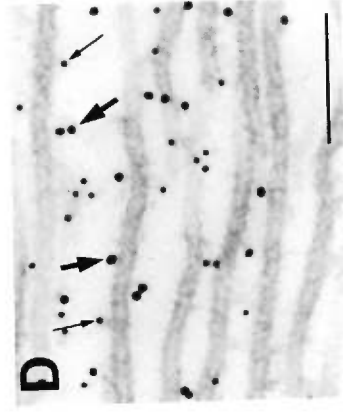
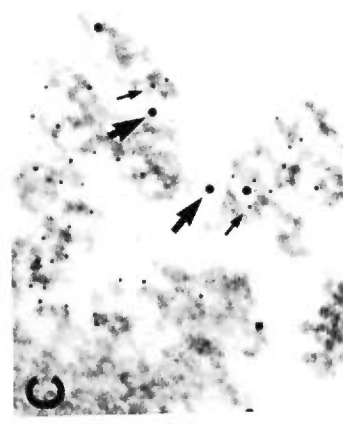
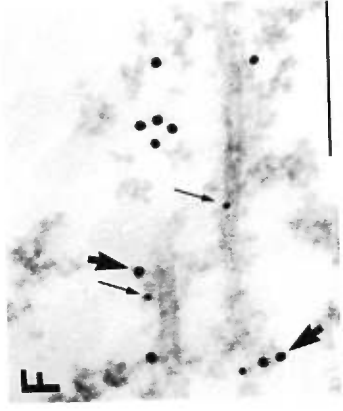
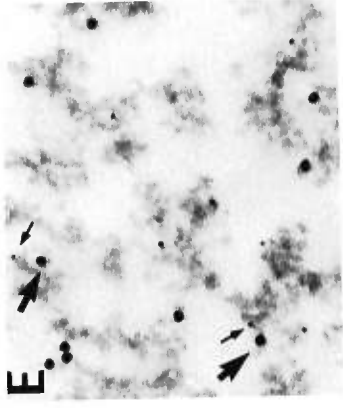
- Martin, M., Andréoli, C., Sahuquet, A., Montcourrier, P., Algrain, M. and Mangeat, P. (1995) Ezrin NH₂-terminal domain inhibits the cell extension activity of the COOH-terminal domain. *J. Cell Biol.* 128:1081-1093.
- Matus, A. (1994) Stiff microtubules and neuronal morphology. *Trends Neurosci.* 17:19-22.
- Mitchison, T. and Kirschner, M. (1988) Cytoskeletal dynamics and nerve growth. *Neuron* 1:761-77.
- Neve, R.L., Harris, P., Kosik, K.S., Kurnit, D.M. and Donlon, T.A. (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.
- Otey, C.A., Kalnoski, M.H., Lessard, J.L. and Bulinski, J.C. (1986) Immunolocalization of the Gamma isoform of nonmuscle actin in cultured cells. *J. Cell Biol.* 102:1726-1737.
- Papandrikopoulou, A., Doll, T., Tucker, R.P., Garner, C.C. and Matus, A. (1989) Embryonic MAP2 lacks the cross-linking sidearm sequences and dendritic targeting signal of adult MAP2. *Nature* 340:650-652.
- Philpot, B., Lim, J., Halpain, S. and Brunjes P (1997) Experience-dependent modifications in MAP2 phosphorylation in rat olfactory bulb. *J. Neurosci.* 17:9596-9604.
- Quinlan, E. and Halpain, S. (1996b) Emergence of activity-dependent, bidirectional control of microtubule-associated protein MAP2 phosphorylation during postnatal development. *J. Neurosci.* 16:7627-7637.
- Sanchez, C., Diaz-Nido, J. and Avila, J. (1995) Variations in in vivo phosphorylation at the proline-rich domain of the microtubule-associated protein 2 (MAP2) during brain development. *Biochem J* 306:481-487.

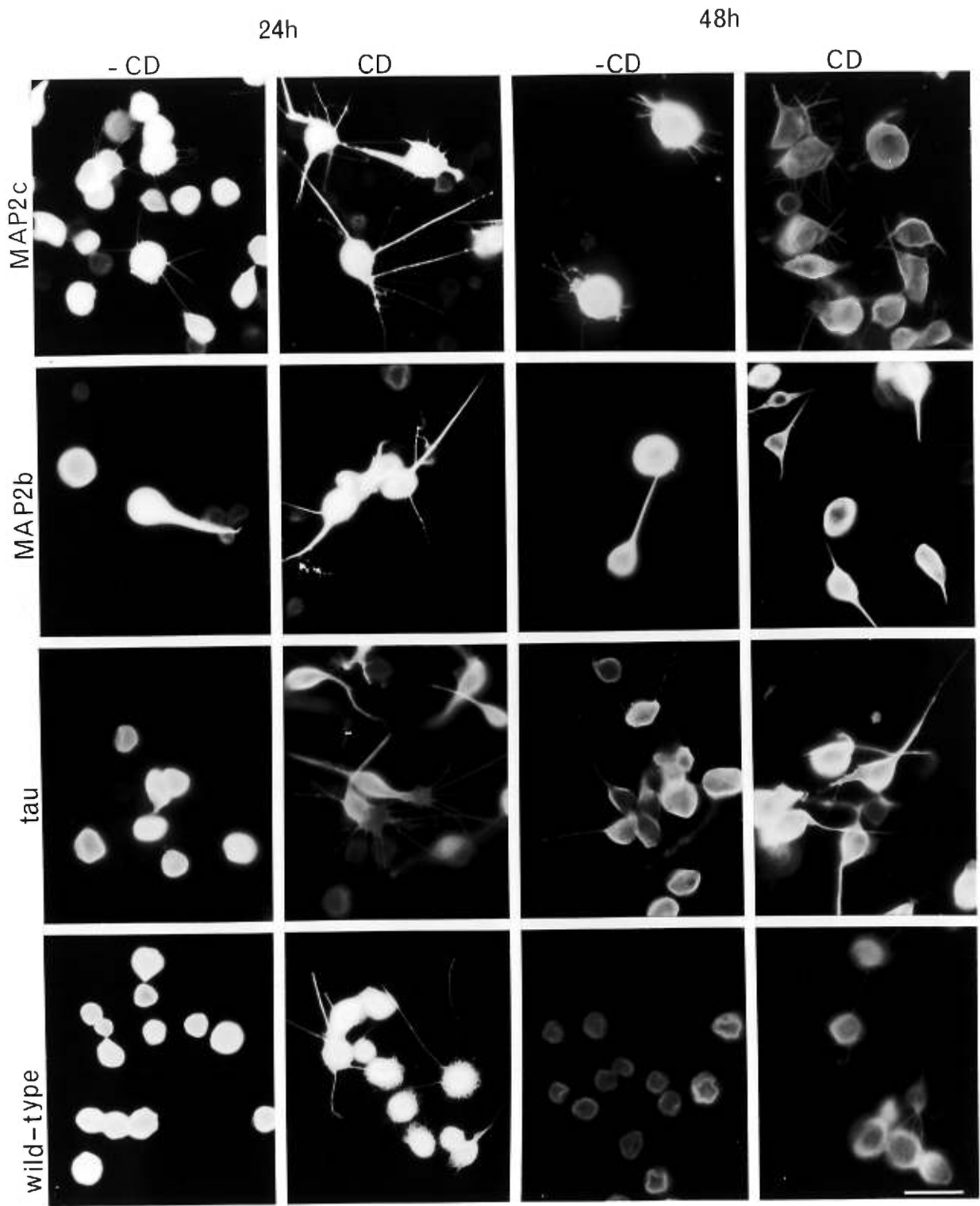
- Sattilaro, R. (1986) Interaction of microtubule-associated protein 2 with actin filaments. *Biochemistry* 25:2003-2009.
- Sattilaro, R., Dentler, W.L. and LeCluyse, E.L. (1981) Microtubule-associated proteins (MAPs) and the organization of actin filaments in vitro. *J. Cell Biol.* 90:467-473.
- Schevzov, G., Lloyd, C. and Gunning, P. (1992) High level expression of transfected b- and g-actin genes differentially impacts on myoblast cytoarchitecture. *J. Cell Biol.* 117:775-786.
- Selden, S.C. and Pollard, T.D. (1983) Phosphorylation of microtubule-associated proteins regulates their interaction with actin filaments. *J. Biol. Chem.* 258:7064-7071.
- Threadgill, R., Bobb, K. and Ghosh, A. (1997) Regulation of dendritic growth and remodeling by Rho, Rac and Cdc42. *Neuron* 19:625-634.
- Tucker, R. (1990) The role of microtubule-associated proteins in brain morphogenesis: a review. *Brain Res. Rev.* 15:101-120.
- Tucker, R. and Matus, A. (1988) Microtubule-associated proteins characteristic of embryonic brain are found in the adult mammalian retina. *Dev. Biol.* 130:423-434.
- Viereck, C., Tucker, R. and Matus, A. (1989) The adult rat olfactory system expresses microtubule-associated proteins found in the developing brain. *J. Neurosci.* 9:3547-3557.
- Yamauchi, T. and Fujisawa, H. (1988) Regulation of the interaction of actin filaments with microtubule-associated protein 2 by calmodulin-dependent protein kinase II. *Biochim. Biophys. Acta* 968:77-85.



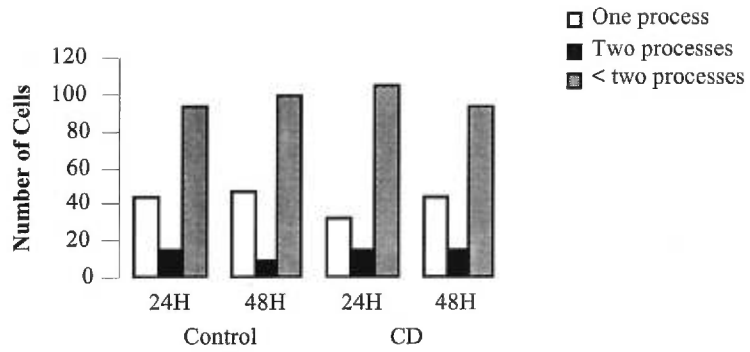




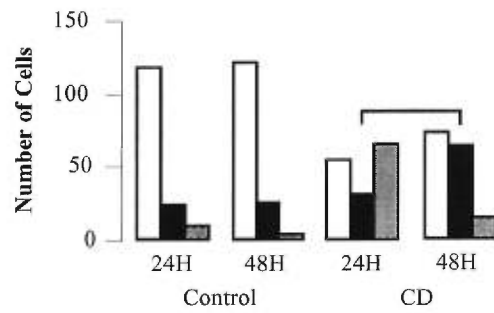




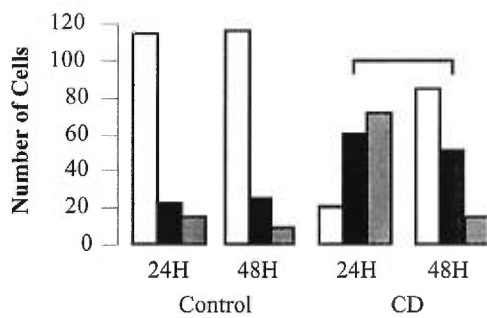
MAP2c-expressing cells



MAP2b-expressing Cells



Tau-expressing Cells



Chapitre troisième

DISCUSSION GÉNÉRALE

et

CONCLUSIONS

Discussion générale

Au cours des dernières années, les protéines associées aux microtubules (MAPs) ainsi que les rôles qu'elles jouent dans la différenciation neuronale ont suscité l'intérêt de nombreux groupes de recherche. Entre autres, il a été démontré que l'expression des MAPs est nécessaire à l'élaboration de prolongements dendritiques et axonaux par un neurone (Caceres and Kosik, 1991; Caceres et al., 1992). Cependant, les connaissances sur le rôle exact de ces protéines dans la réorganisation du cytosquelette, qui survient au cours de la maturation des neurones, restent encore incomplètes. Nous avons donc utilisé le système d'expression du baculovirus afin d'étudier le rôle respectif que jouent les isoformes de MAP2, MAP2c et MAP2b, dans le développement de prolongements cytoplasmiques et dans la réorganisation du cytosquelette. Étant donné que ces différentes MAPs sont co-exprimées dans les neurones, le premier volet de notre étude a porté sur la co-expression de ces différentes MAPs dans les cellules Sf9 afin de comprendre l'équilibre fonctionnel qui existe entre ces protéines dans les neurones. De plus, nous avons examiné les changements de distribution du cytosquelette actinique suite à l'expression de MAP2c et de MAP2b dans les cellules Sf9. Ces deux isoformes ont induit une réorganisation et la stabilisation de l'actine-F. Des études antérieures avaient montré que ces MAPs induisent la stabilisation et la formation de microtubules dans les cellules Sf9 (Leclerc et al., 1996). Toutes ces études suggèrent que MAP2c et MAP2b pourraient donc exercer des effets similaires sur les microtubules et l'actine-F dans les neurones.

Le pattern de production de prolongements cytoplasmiques varie en fonction du ratio MAP2b/MAP2c, MAP2b/tau et MAP2c/tau dans les cellules Sf9

Une faible variation du ratio MAP2b/MAP2c résulte en une altération du pattern de production de prolongements cytoplasmiques dans les cellules Sf9. Une diminution du ratio MAP2b/MAP2c se traduit par un nombre plus grand de cellules avec prolongements en comparaison avec des cellules qui expriment seulement MAP2b. Par contre, le nombre de prolongements par cellule est moins élevé que dans les cellules qui expriment seulement MAP2c. Des effets opposés sont observés lorsque le ratio MAP2b/MAP2c est augmenté. Ceci démontre que le pattern final de production de prolongements cytoplasmiques résulte d'un équilibre fonctionnel entre MAP2b et MAP2c dans les cellules Sf9. Selon les observations précédentes, le ratio MAP2b/MAP2c pourrait varier dans les différentes populations neuronales et ainsi contribuer à leur morphologie distincte. Dans les myoblastes, le niveau relatif d'expression des isoformes d'actine non-musculaires β et γ influence leur morphologie (Schevzov et al., 1992). Alors qu'une expression élevée de l'isoforme β augmente la surface cellulaire de même que l'épaisseur de la cellule, une augmentation du niveau d'expression de l'isoforme γ entraîne les effets opposés. De plus, le phénotype morphologique induit par un ratio élevé d'actine- β / γ varie d'un type cellulaire à un autre. Ceci suggère donc que le contexte cellulaire influence également la fonction de l'actine- β et γ . Par exemple, les cellules L de souris et les cellules érythrocytaires humaines présentent un ratio β/γ élevé mais leur morphologie de même que l'organisation de l'actine-F sont complètement différentes dans ces deux types de cellules (Bennett, 1985; Otey et al., 1986; Tucker, 1990).

Les résultats présentés ici illustrent bien la capacité élevée de MAP2c à induire la production de prolongements cytoplasmiques en comparaison à la faible capacité de MAP2b dans les cellules Sf9. MAP2c est exprimée au stade précoce de la différenciation neuronale qui correspond à une période intense de croissance neuritique (Tucker, 1990). Cependant, le rôle de MAP2c dans la croissance neuritique n'est pas clairement défini. Dans le cerveau adulte, l'expression de MAP2c se retrouve habituellement dans des régions telles que le bulbe olfactif et dans la rétine où la morphologie des neurones demeure dynamique (Tucker and Matus, 1988; Viereck et al., 1989). Cependant, dans des souris transgéniques adultes qui expriment MAP2c, aucune croissance neuritique ou modifications morphologiques ont été notées dans les régions qui habituellement n'expriment pas MAP2c (Marsden et al., 1996). Ceci indique que le ratio MAP2b/MAP2c n'est pas le seul facteur qui contrôle la fonction de MAP2b et MAP2c dans les neurones. In vitro, il a été démontré que l'état de phosphorylation de MAP2 module son interaction avec les microtubules et les microfilaments d'actine (Selden et Pollar, 1983; Yamachi et Fujisawa, 1988 (Drewens et al., 1997)). La phosphorylation de MAP2b et MAP2c varie au cours de la différenciation neuronale (Sanchez et al., 1995). De plus, l'activité neuronale peut moduler l'état de phosphorylation de MAP2b dans le cerveau adulte. Par exemple, dans le bulbe olfactif, le blocage du conduit odorant résulte en une diminution de la phosphorylation de MAP2b (Philpot et al., 1997). Ces modifications de l'état de phosphorylation de MAP2b pourrait induire une réorganisation du cytosquelette et conséquemment une altération de la morphologie du neurone. En effet, il a été montré que la ramification des dendrites et des axones est modulée par la phosphorylation des protéines dans des cultures primaires de neurones provenant de l'hippocampe (Audesirk et al., 1997). Il a été noté qu'il y a phosphorylation des isoformes de MAP2 dans les cellules Sf9 (Cheley et al., 1992). La phosphorylation de MAP2b peut donc altérer son aptitude à induire la production de prolongements cytoplasmiques alors que celle de

MAP2c favoriserait son abilité dans les cellules Sf9. En conclusions, le niveau d'expression de même que l'état de phosphorylation de MAP2c et MAP2b pourraient contrôler leur fonction dans les cellules.

MAP2b et MAP2c affectent différemment la production de prolongements cytoplasmiques par tau dans les cellules Sf9. Nos observations suggèrent qu'il y a une compétition fonctionnelle entre MAP2c et tau étant donné qu'à une m.o.i. très faible, elles peuvent influencer le pattern de prolongements cytoplasmiques l'une de l'autre dans les cellules Sf9. Dans les cellules qui expriment à la fois MAP2c et tau, il y a une diminution du nombre de cellules avec des prolongements multiples et lorsque le ratio est diminué et une augmentation du nombre de cellules avec des prolongements multiples quand le ratio est augmenté. Ceci suggère donc que tau et MAP2c pourraient compétitionner pour un facteur commun qui influence le nombre de prolongements produits par la cellule. Sous l'influence de MAP2c, ce facteur induirait plusieurs prolongements alors que sous l'influence de tau, il produirait un seul prolongement. Une autre possibilité est que le site interactif de chacune de ces MAPs avec ce facteur est inaccessible à cause de la liaison de l'autre MAP. Les effets de MAP2b sur la production de prolongements cytoplasmiques par tau sont plus importants que les effets sur MAP2c. Peu importe le ratio MAP2b/tau, MAP2b bloque presque complètement la capacité de tau à induire des prolongements cytoplasmiques. Il a été démontré que tau doit interagir avec la membrane cellulaire afin d'induire la formation de prolongements dans les cellules PC 12 (Brandt et al., 1995). Il est probable que ce genre d'interactions tau/membrane soient impliquées lors de la formation de prolongements dans les cellules Sf9 qui expriment tau, et par le fait même que MAP2b puisse empêcher cette interaction. Il a été démontré que MAP2b peut lier les microtubules et les microfilaments à la membrane cellulaire via la plectine, qui se lie à la spectrine, une protéine associée à la membrane cellulaire (Herrmann et Wich, 1987). Une étude de distribution a d'ailleurs

confirmé la présence de la plectine, une protéine associée aux filaments intermédiaires, dans le système nerveux central (Errante et al., 1994).

MAP2b et MAP2c réorganisent et stabilisent l'actine-F dans les cellules Sf9

Les évidences qui démontrent le rôle des isoformes de MAP2 dans l'organisation de l'actine-F dans une cellule sont de plus en plus nombreuses. MAP2b et MAP2c peuvent réorganiser l'actine-F dans la lignée cellulaire de mélanome humain, M2, laquelle n'exprime pas la protéine de liaison à l'actine ABP-280 ceci résultant en un bourgeonnement de la membrane cytoplasmique (Cunningham et al., 1997). La microinjection de MAP2c dans cette lignée cellulaire a pu arrêter le bourgeonnement membranaire et induire la formation d'une lamellae riche en actine et la production de prolongements cytoplasmiques alors que MAP2b a seulement bloqué le bourgeonnement membranaire mais n'a pu induire la formation d'une lamellae riche en actine et la production de prolongements cytoplasmiques (Cunningham et al., 1997). Une autre étude a montré que MAP2c et MAP2d peuvent réorganiser l'actine-F dans les cellules HEK (Ferhat et al., 1996). Ici, nous montrons que MAP2c et MAP2b redistribuent l'actine-F dans les cellules Sf9. Dans les cellules qui expriment MAP2c ou MAP2b, l'organisation de l'actine-F en faisceaux n'est pas aussi évidente que dans les cellules HEK transfectées avec MAP2c ou MAP2d. Dans les cellules Sf9, la distribution de l'actine-F est corrélée avec des patterns distincts de production de prolongements cytoplasmiques. Dans les cellules qui expriment MAP2c et qui présentent plusieurs prolongements cytoplasmiques, l'actine-F est concentrée aux sites d'émergence des prolongements au niveau du corps cellulaire. Dans les cellules qui expriment MAP2c et qui présentent un ou deux prolongements, l'actine-F est concentrée aux extrémités des prolongements. Cette distribution rappelle la distribution de l'actine-

F observée dans les cellules HEK transfectées avec MAP2d où l'actine-F est concentrée dans des protusions épineuses qui émanent du corps cellulaire et aux extrémités de protusions larges (Ferhat, et al., 1996). Finalement, dans les cellules qui expriment MAP2b, l'actine-F est plutôt uniformément distribuée dans le corps cellulaire et tout le long du prolongement. Donc, MAP2c et MAP2b exercent des effets distincts sur la distribution de l'actine-F dans les cellules Sf9 comme rapporté pour MAP2c et MAP2d dans les cellules HEK. Dans les cellules HEK, MAP2c et MAP2d confèrent une organisation similaire à l'actine-F et aux microtubules, c-e-d que ces deux éléments cytosquelettiques sont organisés en des faisceaux plus épais et plus denses dans les cellules transfectées avec MAP2c (Ferhat, et al., 1996). Dans les cellules Sf9, des observations similaires n'ont pu être faites étant donné que l'organisation de l'actine-F en faisceaux n'est pas apparente. Le fait que l'expression de MAP2c dans les cellules Sf9 ne résulte pas en une organisation en faisceaux peut signifier que d'autres protéines de liaison à l'actine sont impliquées dans ce phénomène et que ces dernières ne sont pas présentes ou sont inactives dans les cellules Sf9. En conclusions, ces résultats démontrent que les isoformes de MAP2 peuvent influencer la distribution des microtubules et de l'actine-F dans différents types cellulaires.

Plusieurs études ont démontré que MAP2 modifie les propriétés biophysiques de l'actine-F *in vitro* (Sattilaro et al., 1981; Selden and Pollard, 1983; Sattilaro, 1986; Yamauchi and Fujisawa, 1988; Correas et al., 1990). Des études récentes démontrèrent que la concentration de MAP2c peut moduler ses effets sur l'actine-F *in vitro*. Il a notamment été démontré que, à faible concentration, MAP2c induit la formation d'un gel isotropique d'actine-F, alors que, à forte concentration, elle induit plutôt le regroupement des filaments d'actine sous forme de faisceaux (Cunningham et al., 1997). Les différents patterns de production de prolongements cytoplasmiques induits par MAP2c et les différentes distribution de l'actine-F pourraient être expliqués par le

fait que la concentration de MAP2c varie d'une population de cellules à une autre. Étant donné que tau, une protéine qui entraîne la formation de faisceaux d'actine-F, induit l'élaboration d'un simple prolongement dans les cellules Sf9, il est fort probable que dans les cellules exprimant MAP2c et ne développant qu'un seul prolongement, l'actine-F présente une organisation en faisceaux (Cunningham et al., 1997). Dans les cellules qui expriment tau, l'actine-F est concentrée à l'extrémité du prolongement comme noté dans les cellules exprimant MAP2c et ne développant qu'un seul prolongement (Knowles et al., 1997). Par contre, dans les cellules exprimant MAP2c et développant de multiples prolongements, l'actine-F se retrouverait plutôt organisée sous la forme d'un gel isotropique. De plus, il a été démontré que MAP2b et tau, contrairement à MAP2c, sont incapables d'induire la formation d'un tel gel (Cunningham et al., 1997). Les microtubules pourraient avoir une facilité à pénétrer ce gel induit par MAP2c et ainsi induire la formation et l'élongation de prolongements cytoplasmiques. Ceci pourrait expliquer la forte tendance que possède MAP2c à induire la formation de multiples prolongements comparativement à ce qui est observé dans le cas de MAP2b et tau. Les données décrites plus haut, nous indiquent que MAP2c et MAP2b exercent des effets distincts sur l'organisation de l'actine-F et ceci influence leur capacité à produire des prolongements cytoplasmiques.

Nous avons démontré dans l'étude présentée ici que MAP2c et MAP2b confèrent une certaine stabilité aux filaments d'actine dans les cellules Sf9. Cependant, la microinjection de la protéine MAP2c, purifiée du système d'expression du baculovirus, dans une lignée cellulaire de mélanomes n'exprimant pas la protéine de liaison à l'actine ABP-280, provoque l'arrêt du bourgeonnement membranaire (lequel est causé par l'absence d'ABP-280) mais ne protège pas l'actine-F contre l'action de la CD (Cunningham et al., 1997). De façon similaire, dans les cellules HEK, MAP2c est incapable de stabiliser l'actine-F, contrairement à MAP2d (Ferhat et al., 1996).

Ces divergences quand à l'effet stabilisateur de MAP2c sur l'actine-F pourraient être expliquées par le degré d'expression de MAP2c, lequel est plus élevé dans les cellules Sf9 (Leclerc et al., 1996). De plus, il a été démontré que l'état de phosphorylation de MAP2 affecte son affinité de liaison à l'actine-F. Il y a phosphorylation de MAP2 dans les cellules Sf9 comme le révèle l'anticorps AP18 dirigé contre la forme phosphorylée de MAP2 (Berling et al., 1994; Leclerc, et al., 1996). Donc, la phosphorylation de MAP2 pourrait varier d'un type cellulaire à un autre et ainsi les effets de MAP2 sur l'actine-F varieraient également.

Des études antérieures ont démontré la présence de sites de liaison à l'actine dans la structure de MAP2, notamment dans le domaine C-terminale, où le deuxième motif de liaison aux microtubules contiendrait un tel site (Correas et al., 1990). De plus, le fait que MAP2d, contrairement à MAP2c, stabilise l'actine-F dans les cellules HEK indique que la séquence additionnelle de liaison aux microtubules que l'on retrouve dans le domaine C-terminal de MAP2d est impliquée dans la stabilisation de l'actine-F (Ferhat, et al., 1996). Un second site de liaison à l'actine serait également présent dans la région N-terminale de MAP2 (Sattilaro et al., 1981). Il semble que l'insertion de la séquence de 1372 acides aminés dans la région N-terminale de MAP2b altère les interactions de cette dernière avec les microfilaments d'actine. Ceci est d'ailleurs corroboré par une étude démontrant que MAP2b et MAP2c, purifiés à l'aide du baculovirus, induisent une réorganisation distincte de l'actine-F *in vitro* (Cunningham et al., 1997). Il a été démontré pour l'ezrin, une protéine qui lie tant les microfilaments que les microtubules, que la région N-terminale régule l'activité de liaison à l'actine du domaine C-terminal. Bien qu'une sur-expression de l'ezrin dans les cellules Sf9 n'induit pas la formation de prolongements, l'expression de son domaine C-terminal est quand à elle suffisante pour provoquer cette modification morphologique (Martin et al., 1995). Cet effet est par ailleurs complètement aboli par la co-expression de son domaine N-terminal. Une autre

possibilité est que la séquence additionnelle insérée dans la région N-terminale de MAP2b pourrait contenir un certain nombre de sites de phosphorylation capables de moduler l'activité de liaison à l'actine de MAP2 (Selden and Pollard, 1983; Yamauchi and Fujisawa, 1988).

Lorsque les cellules exprimant MAP2b sont traitées à la CD, on observe un nombre plus grand de prolongements par cellule, de même qu'un nombre de cellules avec au moins un prolongement qui est plus élevé que ce qui est observé dans le cas des cellules contrôles. Ces changements étant similaires à ceux qui surviennent lorsque MAP2c est co-exprimée dans des cellules exprimant MAP2b, cela suggère que MAP2c agit sur l'actine-F dans les cellules qui expriment l'isoforme adulte. Cependant le nombre de prolongements par cellule étant inférieur à ce qui est observé pour les cellules exprimant uniquement MAP2c, il semble que MAP2b puisse modifier la capacité de réorganisation que possède l'actine-F en présence de MAP2c. Ceci pourrait être causé par l'effet stabilisateur de MAP2b qui survient à un stage très précoce de l'infection. MAP2b altère de façon très importante l'abilité de tau à initier la production de prolongements cytoplasmiques. Comme démontré antérieurement, la production de prolongements cytoplasmiques par tau implique une réorganisation de l'actine-F dans les cellules Sf9 (Knowles et al., 1994). Donc, MAP2b pourrait prévenir l'interaction de tau avec l'actine-F. Ceci pourrait même signifier que MAP2b et tau compétitionnent pour un même site de liaison à l'actine-F.

Rôle distincts des isoformes MAP2c et MAP2b dans l'élaboration des neurites

Nos données suggèrent que MAP2c joue un rôle important quant à l'initiation de la formation des prolongements cytoplasmiques et qu'elle est capable de coopérer avec

les autres MAPs dans ce processus d'initiation tel que démontré par nos études de co-expression. Au cours de la différenciation neuronale, le niveau d'expression de MAP2c diminue alors que celui de MAP2b augmente (Ludin et Matus, 1993). MAP2c pourrait donc assister MAP2b lors de l'initiation de la formation des prolongements aux premiers stades de la différenciation neuronale. Par la suite, MAP2b serait suffisante à elle seule pour maintenir la morphologie neuronale. Aucun effet n'a d'ailleurs été observé en ce qui concerne le réarrangement et la morphologie neuronale dans une lignée de souris transgénique exprimant MAP2c à un degré plus élevé (comparativement à l'isoforme adulte) suggérant que la forme juvénile ne serait pas impliquée dans la régulation de la morphologie des neurones déjà différenciés (Mardsen et al., 1996). Pendant la différenciation neuronale, MAP2b se retrouve dans les dendrites alors que tau est concentré dans l'axone. MAP2c se retrouve dans les compartiments dendritiques et axonaux. Les résultats présentés ici suggèrent que MAP2b pourrait restreindre la capacité de tau à induire la production de prolongements cytoplasmiques. Ceci pourrait contribuer à leur ségrégation dans des compartiments neuronaux distincts et à l'élaboration de la polarité neuronale. Tau semble exercer un effet négatif sur la capacité de MAP2c à générer des prolongements multiples. Cette compétition fonctionnelle entre MAP2c et tau pourrait participer à la transition de neurites mineures à l'élaboration d'un seul prolongement axonal. En effet, la suppression de l'expression de tau dans des cultures primaires de neurones abolit la différenciation d'un prolongement axonal alors que la suppression de MAP2 empêche la formation de neurites mineures (Caceres and Kosik, 1991; Caceres, et al., 1992).

Il a été démontré que le cytosquelette microtubulaire et actinique est fortement régulé par les petites GTPases (Machesky et Hall, 1996; Cook et al., 1998). Des études récentes ont d'ailleurs démontré que ces petites GTPases jouent un rôle important quant à la morphologie des dendrites (Threadgill et al., 1997). Il est donc plus que probable que ces petites protéines G puissent réguler les interactions des différentes

MAPs avec le cytosquelette d'actine et les microtubules lors de la différenciation de l'axone et des dendrites. Des études seront dès lors nécessaires afin d'examiner les associations de ces MAPs avec le cytosquelette durant l'inhibition ou l'activation de ces GTPases.

Comme MAP2b et MAP2c ne diffèrent l'une de l'autre que par une séquence de 1372 acides aminés, il serait intéressant de déterminer le rôle exact de cette région (Papandriopoulou et al., 1989). Mentionnons que l'expression, dans les cellules Sf9, d'une construction similaire à MAP2c, mais contenant une partie du domaine de projection, induit un phénotype intermédiaire à ceux observés pour MAP2c et MAP2b (Leclerc et al., 1993). Des études de mutagénèses dirigées au sein de cette séquence d'épissage, de même que des analyses biochimiques, pourraient permettre de comprendre davantage les mécanismes d'action de ces deux isoformes et leur rôle dans la régulation et la coordination des divers éléments du cytosquelette neuronal.

Chapitre quatrième

BIBLIOGRAPHIE

- Alan VJ, Vale RD, Navone F (1991) Microtubule-based organelle transport in neurons. In: *The Neuronal Cytoskeleton* (Burgoyne RD, ed), pp 257-282. New York: Wiley-Liss.
- Albert B, Bray D, Lewis J, Raff M, Roberts K, Watson JD (1995) *Biologie moléculaire de la cellule-Troisième édition*, pp 36-37. Paris: Médecine-Sciences Flammarion.
- Arnold SE, Lee VM, Gur RE, Trojanowski JQ (1991) Abnormal expression of two microtubule-associated proteins (MAP2 and MAP5) in specific subfields of the hippocampal formation in schizophrenia. *Proc. Natl Acad. Sci. USA* 88:10850-10854.
- Audesirk G, Cabell L, Kern M (1997) Modulation of neurite branching by protein phosphorylation in cultured rat hippocampal neurons. *Brain Res. Develop. Brain Res.* 102:247-60.
- Bamburg JR, Bernstein BW (1991) Actin and actin-binding proteins in neurons. In: *The Neuronal Cytoskeleton* (Burgoyne RD, ed), pp 121-160. New York: Wiley-Liss.
- Bartlett WP, Banker GA (1984) An electron microscopic study of the development of axons and dendrites by hippocampal neurons in culture. Cells which develop without intercellular contacts. *J. Neurosci.* 4:1944-1953.
- Bennett V (1985) The membrane skeleton of human erythrocytes and its implications for more complex cells. *Annu. Rev. Biochem.* 54:273-304.
- Berling B, Wille H, Roll B, Mandelkow E, Garner C, Mandelkow E (1994) Phosphorylation of microtubule-associated proteins MAP2a,b and MAP2c at Ser136 by proline-directed kinases in vivo and in vitro. *Eur. J. Cell Biol.* 64:120-130.
- Brandt, R., Léger, J. and Lee G (1995) Interaction of tau with the neural plasma membrane mediated by tau's amino-terminal projection domain. *J. Cell Biol.* 131:1327-1340.

- Brugg B, Matus A (1991) Phosphorylation determines the binding of microtubule-associated protein 2 (MAP2) to microtubules in living cells. *J. Cell Biol.* 114:735-743.
- Caceres A, Banker GA, Stewart O, Binder L, Payne M (1984) MAP2 is localized to the dendrites of hippocampal neurons which develop in culture. *Dev. Brain Res.* 13:314-318.
- Caceres A, Kosik K (1991) Inhibition of neurite polarity by tau antisense oligonucleotides in primary cerebellar neurons. *Nature* 343:461-463.
- Caceres A, Mautino J, Kosik KS (1992) Suppression of MAP2 in cultured cerebellar macroneurons inhibits minor neurite formation. *Neuron* 9:607-618.
- Cheley S, Kosik K, Paskevich P, Bakalis S, Bayley H (1992) Phosphorylated baculovirus p10 is a heat-stable microtubule-associated protein associated with process formation in Sf9 cells. *J. Cell Sci.* 102:739-752.
- Chung WJ, Kindler S, Seidenbecher C, Garner CC (1996) MAP2a, an alternatively spliced variant of microtubule-associated protein 2. *J. Neurochem.* 66:1273-81.
- Cook T, Nagasaki T, Gundersen G (1998) Rho guanosine triphosphatase mediates the selective stabilization of microtubules induced by lysophosphatidic acid. *J. Cell Biol.* 141:175-185.
- 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.

- Ding M, Vandré DD (1996) High molecular weight microtubule-associated proteins contain O-linked N-acetylglucosamine. *J. Biol. Chem.* 271:12555-12561.
- Doll T, Meichsner M, Riederer BM, Honegger P, Matus A (1993) An isoform of microtubule-associated protein 2 (MAP2) containing four repeats of the tubulin binding motif. *J. Cell Sci.* 106:633-640.
- Dotti C, Sullivan C, Banker G (1988) The establishment of polarity in hippocampal neurons in culture. *J. Neurosci.* 8:1454-1468.
- Drewens G, Ebnet A, Preuss U, Mandelkow E-M, Mandelkow E (1997) MARK, a novel family of protein kinases that phosphorylate microtubule-associated proteins and trigger microtubule disruption. *Cell* 89:297-308.
- Edson K, Weisshaar B, Matus A (1993) Actin depolymerisation induces process formation on MAP2-transfected non-neuronal cells. *Development* 117:689-700.
- Errante LD, Wiche G, Shaw G (1994) Distribution of plectin, an intermediate filament-associated protein, in the adult rat central nervous system. *J. Neurosci. Res.* 37:515-528.
- Ferhat L, Ben-Ari Y, Khrestchatisky M (1994b) Complete sequence of rat MAP2d, a novel MAP2d isoform. *C.R. Acad.Sci. Paris* 317:304-309.
- Ferhat L, Represa A, Bernard A, Ben-Ari Y, Khrestchatisky M (1996) MAP2d promotes bundling and stabilization of both microtubules and microfilaments. *J. Cell Science* 109:1095-1103.
- Ferreira A, Busiglio J, Caceres A (1989) Microtubule formation and neurite growth in cerebellar macroneurons which develop in vitro: Evidence for the involvement of the microtubule-associated proteins, MAP-1a, HMW-MAP2, tau. *Dev. Brain Res.* 49:213-228.
- Forscher P, Smith SJ (1988) Actions of cytochalasins on the organization of actin filaments and microtubules in a neuronal growth cone. *Journal of Cell Biology* 107:1505-1516.

- Fulton AB (1984) Protein chemistry. In: *The Cytoskeleton, Cellular Architecture and Choreography* (Edidin WJBaM, ed), pp New York: Chapman and Hall.
- Gai WP, Blumbergs PC, Blessing WW (1996) Microtubule-associated protein 5 is a component of Lewy bodies and Lewy neurites in the brainstem and forebrain regions affected in Parkinson's disease. *Acta Neuropatho.* 91:78-81.
- Hagestedt T, Lichtenberg B, Wille H, Mandelkow E-M, Mandelkow E (1989) Tau protein becomes long and stiff upon phosphorylation: correlation between paracrystalline structure and degree of phosphorylation. *J. Cell Biol.* 109:1643-1651.
- Heins S, Aebi U (1994) Making heads and tails of intermediate filament assembly, dynamics and networks. *Cur. Op. Cell Biol.* 6:25-33.
- Herman I (1993) Actin isoforms. *Curr. Opin. Cell Biol.* 5:48-55.
- Herrman H, Wiche G (1987) Plectin and IFAP-300K are homologous proteins binding to microtubule-associated proteins 1 and 2 and to the 240-kilodalton subunit of spectrin. *J. Biol. Chem.* 262:1320-1325.
- Hillman DE (1988) Parameters of dendritic shape and substructure: Intrinsic and extrinsic determinants? In: *Intrinsic determinants of neuronal form and function* (Black RJLaMM, ed), pp 83-113. New York: Alan R., Inc.
- Hirokawa N (1991) Molecular architecture and dynamics of the neuronal cytoskeleton. In: *The Neuronal Cytoskeleton* (Burgoyne RD, ed), pp 5-74. New York: Wiley-Liss.
- Hirokawa N (1994) Microtubule organization and dynamics dependent on microtubule-associated proteins. *Curr. Opin. Cell Biol.* 6:74-81.
- Kikuchi S, Kim SU (1993) Glutamate neurotoxicity in mesencephalic dopaminergic neurons in culture. *J. Neurosci. Res.* 36:558-569.

- Knops J, Kosik KS, Pardee JD, Cohen-Gould L, McConlogue L (1991)
Overexpression of tau in a nonneuronal cell induces long cellular processes.
J. Cell Biol. 114:725-733.
- 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.
- Kosik K, Finch EA (1987) MAP2 and tau segregate into axonal and dendritic domains
after elaboration of morphologically distinct neurites: an immunocytochemical
study of cultured rat cerebrum. J. Neurosci. 7:3142-3153.
- Kosik K, McConlogue L (1994) Microtubule-associated protein function: lessons from
expression in *Spodoptera frugiperda* cells. Cell Motil. Cyto. 28:195-198.
- 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 (1990) Tau protein: an update on structure and function. Cell Motil. Cyto.
15:199-203.
- Lee VM-Y (1995) Disruption of the cytoskeleton in Alzheimer's disease.
Curr. Op. Neurobiol. 5:663-668.
- Létourneau PC, Shattuck TA, Ressler AH (1987) "Pull" and "Push" in neurite
elongation: Observations on the effects of different concentrations of
cytochalasin B and taxol. Cell Motil. Cyto. 8:193-209.
- Ludin B. and Matus A. (1993). The neuronal cytoskeleton and its role in axonal and
dendritic plasticity. Hippocampus 3:61-72.
- Mandelkow EM, Biernat J, Drewes G, Gustke N, Trinczek B, Mandelkow E (1995)
Tau domains, phosphorylation, and interactions with microtubules. Neurobiol.
Aging 16:355-362.

- Marsden K, Doll T, Ferralli J, Botteri F, Matus A (1996) Transgenic expression of embryonic MAP2 in adult mouse brain: Implications for neuronal polarization. *J. Neurosci.* 16:3265-3273.
- Martin M, Andréoli C, Sahuquet A, Montcourrier P, Algrain M, Mangeat P (1995) Ezrin NH₂-terminal domain inhibits the cell extension activity of the COOH-terminal domain. *J. Cell Biol.* 128:1081-1093.
- McLaughlin PJ, Weeds AG (1995) Actin-binding protein complexes at atomic resolution. *Annu. Rev. Biophys. Biomol. Struct.* 24:643-675.
- Mitchison T, Kirschner M (1988) Cytoskeletal dynamics and nerve growth. *Neuron* 1:761-77.
- 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.
- Olmsted JB (1991) Non-motor microtubule-associated proteins. *Curr. Opin. Cell Biol.* 3:52-58.
- Otey CA, Kalnoski MH, Lessard JL, Bulinski JC (1986) Immunolocalization of the Gamma isoform of nonmuscle actin in cultured cells. *J. Cell Biol.* 102:1726-1737.
- Papandrikopoulou A, Doll T, Tucker RP, Garner CC, Matus A (1989) Embryonic MAP2 lacks the cross-linking sidearm sequences and dendritic targeting signal of adult MAP2. *Nature* 340:650-652.
- Peng A, I. BL, Black MM (1986) Biochemical and immunological analyses of cytoskeletal domains of neurons. *J. Cell Biol.* 102:252-262.
- Philpot B, Lim J, Halpain S, Brunjes P (1997) Experience-dependent modifications in MAP2 phosphorylation in rat olfactory bulb. *J. Neurosci.* 17:9596-9604.

- Riederer BM, Draberova E, Viklicky V, Draber P (1995) Changes of MAP2 phosphorylation during brain development. *J. Histochem. Cytochem.* 43: 1269-1284.
- Sanchez C, Diaz-Nido J, Avila J (1995) Variations in in vivo phosphorylation at the proline-rich domain of the microtubule-associated protein 2 (MAP2) during brain development. *Biochem J* 306:481-487.
- Sattilaro R (1986) Interaction of microtubule-associated protein 2 with actin filaments. *Biochemistry* 25:2003-2009.
- Sattilaro R, Dentler WL, LeCluyse EL (1981) Microtubule-associated proteins (MAPs) and the organization of actin filaments in vitro. *J. Cell Biol.* 90:467-473.
- Selden SC, Pollard TD (1983) Phosphorylation of microtubule-associated proteins regulates their interaction with actin filaments. *J. Biol. Chem.* 258:7064-7071.
- Schevzov, G., Lloyd, C. and Gunning, P. (1992) High level expression of transfected b- and g-actin genes differentially impacts on myoblast cytoarchitecture. *J. Cell Biol.* 117:775-786.
- Schliwa M (1982) Action of cytochalasin D on cytoskeletal networks. *J. Cell Biol.* 92:79-91.
- 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.
- Shaw G (1991) Neurofilament proteins. In: *The Neuronal Cytoskeleton* (Burgoyne RD, ed), pp 185-215. New York: Wiley-Liss.
- Smith CA (1994) The initiation of neurite outgrowth by sympathetic neurons grown in vitro does not depend on assembly of microtubules. *J. Cell Biol.* 127:1407-1418.
- Steiner B, Mandelkow E-M, Biernat J, Gustke N, Meyer HE, Schmidt B, Mieskes G, Soling HD, Drechsel D, Kirschner MW, Goedert M, Mandelkow E (1990) Phosphorylation of microtubule-associated protein tau: identification of the site

- for Ca²⁺-calmodulin dependent kinase and relationship with tau phosphorylation in Alzheimer tangles. *EMBO J.* 9:3539-3544.
- Tanaka E, Sabry J (1995) Making the connection: Cytoskeletal rearrangements during growth cone guidance. *Cell* 83:171-176.
- Threadgill, R., Bobb, K. and Ghosh, A. (1997) Regulation of dendritic growth and remodeling by Rho, Rac and Cdc42. *Neuron* 19:625-634.
- Tucker R (1990) The role of microtubule-associated proteins in brain morphogenesis: a review. *Brain Res. Rev.* 15:101-120.
- Tucker R, Matus A (1988) Microtubule-associated proteins characteristic of embryonic brain are found in the adult mammalian retina. *Dev. Biol.* 130:423-434.
- Tsuyama S, Terayama Y, Matsuyama S (1987) Numerous phosphates of microtubules-associated protein 2 in living rat brain. *J. Biol. Chem.* 262:10886-10892.
- Viereck C, Tucker R, Matus A (1989) The adult rat olfactory system expresses microtubule-associated proteins found in the developing brain. *J. Neurosci.* 9:3547-3557.
- Whitaker-Azmitia PM, Borella A, Raio N (1995) Serotonin depletion in the adult rat causes loss of dendritic marker MAP-2. A new animal model of schizophrenia ? *Neuropsychopharm.* 12:269-272.
- Yamanouchi H, Zhang W, Jay V, Becker LE (1996) Enhanced expression of microtubule-associated protein 2 in large neurons of cortical dysplasia. *Ann. Neurol.* 39:57-61.
- 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.

ANNEXE

Contribution des différents auteurs

L'article révisé a été accepté pour publication dans le journal Cell Motility and Cytoskeleton. Cet article a été produit avec les collaborations suivantes:

- **Mathieu Boucher**, 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 entièrement rédigé ce mémoire de maîtrise.

- **Clermont Beaulieu, Ph.D.**, co-directeur de recherche, a contribué au développement de la technique de marquage à l'or colloïdal dans le laboratoire de Nicole Leclerc.

- **Annie Vallée**, technicienne de laboratoire, a participé à l'étude de la localisation subcellulaire de MAP2c et MAP2b par un marquage à l'or colloïdal dans les cellules Sf9. Elle a préparé les coupes pour l'observation au microscope électronique. De plus, elle nous a assisté dans l'observation et la prise de photos au microscope électronique.

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