

NNT : 2016SACLE061

THESE DE DOCTORAT DE L'UNIVERSITE Paris-Saclay

PREPAREE A L'UNIVERSITE EVRY VAL D'ESSONNE,

ÉCOLE DOCTORALE N°577

Structure et dynamique des systèmes vivants

En Sciences de la vie et de la santé

« Structure et dynamique des fagots de microtubules : Implication
de la protéine Tau »

Par

Alix Méphon-Gaspard

Thèse présentée et soutenue à Evry, le 7 Novembre 2016

Composition du Jury :

Pr, Savarin, Philippe

Pr, Buée, Luc

Dr, Parmentier, Marie-Laure

Dr, Janke, Carsten

Pr, Pastré, David

Dr, Hamon, Loïc

Professeur à l'Université Paris 13, Bobigny

DR1 (CNRS) à l'UMR-S 1172, Lille.

DR2 (NSERM) à l'IGF, Montpellier.

DR1 (CNRS) à l'Institut Curie, Orsay.

Professeur à l'UEVE, Evry.

MCF à l'UEVE, Evry.

Président

Rapporteur

Rapporteur

Examineur

Directeur de thèse

Co-directeur de thèse

La Terre est bleue

“

*La terre est **bleue** comme une **orange**
Jamais une erreur les mots ne mentent pas
Ils ne vous donnent plus à chanter
Au tour des baisers de s'entendre
Les fous et les amours
Elle sa bouche d'alliance
Tous les secrets tous les sourires
Et quels vêtements d'indulgence
À la croire toute nue.*

*Les guêpes fleurissent vert
L'aube se passe autour du cou
Un collier de fenêtres
Des ailes couvrent les feuilles
Tu as toutes les joies solaires
Tout le soleil sur la terre
Sur les chemins de ta beauté.*

”

Paul Eluard, *L'amour la poésie*, 1929

Je dédie cette thèse à mes proches, et en particulier aux J. Gaspard.

Remerciements

A l'issue de la rédaction de cette thèse, je réalise que le travail de recherche est loin d'être un travail solitaire. En effet, ce travail doctoral n'aurait pas abouti sans le soutien d'un grand nombre de personnes dont la générosité, la bonne humeur et l'implication manifestées à l'égard de ma thèse m'ont permis de progresser dans cette phase délicate d'apprentissage.

En premier lieu, je tiens à exprimer mes plus vifs remerciements à mes directeurs de thèse, **Pr. David Pastré** et **Dr. Loïc Hamon**, d'une part pour la confiance qu'ils m'ont accordée en acceptant de m'encadrer lors de mon stage de M2, et d'autre part pour avoir su orienter mes recherches durant les trois années de thèse qui ont suivi. Je sors grandie de cette expérience grâce à leurs impulsions, leurs regards critiques, leurs grandes disponibilités et la qualité de nos discussions scientifiques tout au long de ce travail doctoral. Enfin, j'ai été extrêmement sensible à leur respect sans faille des délais serrés de relecture des documents que je leur ai adressés.

Je tiens également à exprimer mes plus vifs remerciements aux rapporteurs de cette thèse, **Pr. Luc Buée** et **Dr. Marie-Laure Parmentier**, et aux autres membres de mon jury, **Pr. Philippe Savarin** et **Dr. Carsten Janke**, d'avoir accepté de juger ce travail.

Je tiens également à remercier les membres de mon comité de thèse pour l'intérêt qu'ils ont porté à ce travail et pour les remarques constructives qu'ils ont fait sur mon projet de thèse.

J'adresse ensuite ma très sincère reconnaissance à **Michel Cailleret**, **Bénédicte Desforges**, et **Mirela Boca** pour avoir accepté de partager avec moi leurs connaissances théoriques et techniques, de biologie cellulaire, moléculaire et de biochimie, sans lesquelles la production et la purification des protéines utilisées dans ce travail n'auraient pas été possible. En ce qui concerne l'aide technique que j'ai pu recevoir durant cette thèse, je me dois également de remercier **MJ**, la kafrine do fé, pour avoir fait bénéficier à mon projet de son expertise en RMN.

Par ailleurs, Je tiens à remercier toutes les personnes avec qui j'ai pu collaborer durant ces trois ans notamment **Cyril Bauvais** et **Guillaume Bollot** de Synsight pour leur expertise en modélisation dynamique, et **Olivier Piètrement** et **Catherine Durieu** de l'institut Gustave Roussy. Enfin, ce paragraphe ne serait pas complet si je n'en profitais pas pour transmettre toute ma gratitude à **Lydia Lebouil** et **Jean Salone** qui travaillent dans l'ombre mais dont la contribution à mon travail est non négligeable.

Je tiens aussi à mentionner le plaisir que j'ai eu à travailler au sein du laboratoire SABNP dont je remercie tous les membres et ex-membres pour leur accueil et leur générosité. Les nombreuses discussions que j'ai pu avoir avec chacun d'entre vous m'ont beaucoup apporté. Merci donc à **Charbel Maroun, Vandana Joshi, Andrea Burgo, Ahmed Bouhss, Alexandre Maucuer, Guillaume Lambert, Olek Maciejak, Marie-odile David** et, « at last but not least » **Patrick Curmi**.

Mention spéciale à **Régis Gewinner** (Bibi hashtag cœur coeur), **Clément Plaud** (Paddy hashtag lovabeam team), **Imane Hamdi** (Mamane hashtag soleil de mes nuits), **Dmitry Kretov** (Chouchou), **Sanae Abrakhi, Manel Tari** et **Meryem Sari** (Mimi), **Aram Gyulkhandanyan** dont le soutien constant et les sourires ont contribué à ma bonne humeur quotidienne. Très humblement, je voulais vous dire merci pour les gâteaux brûlés volontairement (tourteau fromager), les bretzels (bredele), les makrouds, les poulets au citron, les pads thaïs et les pirojkis. Votre soutien durant mes périodes de doutes et vos multiples encouragements ont été mon oasis dans le désert.

Claire, Ludivine, Vanessa, Andy, Anne, Mehdi, Axelle, Nanou, Odessa et Belynda aucun mot ne saurait décrire le bonheur que je ressens de vous connaître. Je ne sais pas l'écrire mais je vous aime et c'est pourquoi je vous dédie ces quelques vers issus d'une lettre d'Albert Camus à René Char :

« Plus je vieillis et plus je trouve qu'on ne peut vivre qu'avec les êtres qui vous libèrent, qui vous aiment d'une affection aussi légère à porter que forte à éprouver. La vie d'aujourd'hui est trop dure, trop amère, trop anémiant, pour qu'on subisse encore de nouvelles servitudes, venues de qui on aime. À la fin, on mourrait de chagrin, littéralement. Et il faut que nous vivions, que nous trouvions les mots, l'élan, la réflexion qui fondent une joie, la joie. Mais c'est ainsi que je suis votre ami, j'aime votre bonheur, votre liberté, votre aventure en un mot, et je voudrais être pour vous le compagnon dont on est sûr, toujours. »

A cet instant j'ai également une pensée émue pour mes cousins Camille, Evelyne, Germaine, Miguel, Jémima, Aude, Ludovic, Cyrille, Ericka, Amanda, Anémone, Jonathan, Charlène, Johanna sur qui j'ai toujours pu compter. Un merci tout particulier à Cousine Camille pour la relecture finale et méticuleuse de chacun des chapitres.

Ces remerciements ne peuvent s'achever, sans une pensée pour mes premières fans (et correctrice) : ma chère mère (Lolotte) et « mes 2 vieilles » (Toukrik et Tata Ichette) pour leur soutien quotidien indéfectible et leur enthousiasme contagieux à l'égard de mes travaux comme de la vie en général. Leur présence et leurs encouragements sont pour moi les piliers fondateurs de ce que je suis et de ce que je fais.

Table des matières

TABLE DES MATIERES	8
INTRODUCTION GENERALE	11
ETAT DE L'ART	14
I. MICROTUBULES : CARACTERISATION GENERALE ET FONCTIONS	14
A. <i>Architecture et fonctions des Microtubules</i>	14
B. <i>Structure atomique de l'hétérodimère de tubuline</i>	16
C. <i>Dynamique in vitro des MTs</i>	18
- Structures Intermédiaires de dépolymérisation	20
D. <i>Dynamique des MTs dans un contexte cellulaire</i>	21
1. Encombrement macromoléculaire	22
2. Cas particulier des MTs	23
E. <i>Cas particulier des axones</i>	24
F. <i>Transport axonal</i>	25
G. <i>Stabilité des MTs dans l'axone et protéines associées</i>	26
H. <i>Modifications post-traductionnelles (MPTs)</i>	27
II. PROTEINES ASSOCIEES AUX MTs DANS L'AXONE : CAS PARTICULIER DE LA PROTEINE TAU	30
A. <i>Introduction</i>	30
B. <i>Organisation des gènes de Tau et histoire de leur évolution</i>	31
• Analyse Phylogénétique des protéines avec des domaines de liaison aux MTs (MTBDs) homologues à ceux de Tau	31
C. <i>Isoformes de Tau présents dans le système nerveux central (SNC)</i>	33
D. <i>Structure, fonction et charge des domaines de Tau</i>	36
1. Structure et fonction du domaine C-terminal	36
2. Structure et fonction du domaine N-terminal	36
3. Charges de la protéine Tau	37
E. <i>Fonctions axonales de Tau</i>	38
1. Modèle du cross-bridge	41
2. Modèle du polymère Brush	43
3. Ratio molaire Tau :Tubuline dans les axones	46
F. <i>Modifications post-traductionnelles (MPTs) de Tau</i>	46
1. Régulation de l'interaction Tau-Tubuline : la phosphorylation	46
2. Hyperphosphorylation de Tau et maladies neurodégénératives	48
3. Autres MPTs de Tau	51
G. <i>Objectifs de l'étude</i>	52
MATERIELS ET METHODES.....	54
I. TECHNIQUES DE BIOLOGIE MOLECULAIRE ET DE BIOCHIMIE.....	54
A. <i>Clonage des plasmides de Tau</i>	54
1. Principe du clonage Gateway®	54
2. Préparation du vecteur d'entrée pENTR™ /TEV/D-TOPO®	55
3. Transfert dans le vecteur de destination pDEST™ 17®	56
4. Protocole de Clonage	57

B.	<i>Production des protéines Tau humaines dans E. coli</i>	62
C.	<i>Purification des protéines recombinantes</i>	63
D.	<i>Préparation de la tubuline</i>	64
II.	MICROSCOPIE A FORCE ATOMIQUE	65
A.	<i>Description du principe de la microscopie à force atomique</i>	65
B.	<i>Mode peak force</i>	66
C.	<i>Adsorption sur le mica</i>	67
D.	<i>Description de la préparation des échantillons d'AFM</i>	68
III.	MICROSCOPIE ELECTRONIQUE A TRANSMISSION	69
A.	<i>Principe de la microscopie électronique en transmission</i>	69
B.	<i>Description de la préparation de l'échantillon</i>	70
IV.	TURBIDIMETRIE	70
V.	TECHNIQUE DE BIOLOGIE CELLULAIRE	72
A.	<i>Culture de cellules HeLa</i>	72
B.	<i>Immunofluorescence</i>	73
VI.	MESURE DES RATIOS DE FLUORESCENCE.....	73
A.	<i>Principe de la technique</i>	73
B.	<i>Préparation des échantillons</i>	74
C.	<i>Analyse des données</i>	75
III.	RESULTATS	80
	PARTIE 1 : ROLE DE TAU DANS LA MISE EN FAGOT DES MTs	80
A.	<i>Introduction</i>	80
B.	<i>Expression et purification des protéines recombinantes</i>	81
C.	<i>Caractérisation des protéines Tau : exemple de Tau 2N</i>	84
D.	<i>Tau permet la mise en fagot des MTs in vitro via son domaine N-terminal sans encombrement macromoléculaire</i>	85
1.	<i>Influence de Tau 2N sur l'assemblage des microtubules</i>	85
2.	<i>Rôle critique de la partie N-terminale dans la mise en fagots des MTs sans encombrement macromoléculaire</i> 91	
3.	<i>Importance de la force ionique sur la mise en fagot</i>	94
E.	<i>Analyses de l'apparition des fagots de MTs suite à l'expression de Tau dans des cellules HeLa</i>	101
F.	<i>Conclusions de la 1ère partie</i>	107
	PARTIE 2 : ROLE DE L'ENCOMBREMENT MACROMOLECULAIRE SUR L'ORGANISATION DES MTs.....	108
A.	<i>Introduction</i>	108
B.	<i>Rôle de l'encombrement macromoléculaire sur la mise en fagots des MTs</i>	108
C.	<i>Tau inhibe la mise en « fagots serrés » des MTs dans un environnement encombré via son domaine N-terminal in vitro</i>	110
D.	<i>Estimation de la concentration de Tau dans les axones</i>	120
E.	<i>Conclusions de la 2^e partie</i>	126
	PARTIE 3 : STABILISATION DES MTs PAR TAU ET INTERMEDIAIRES DE DEPOLYMERISATION (RESULTATS PRELIMINAIRES)	127
A.	<i>Introduction</i>	127
B.	<i>Effet de Tau sur les intermédiaires de dépolymérisation induits par le froid</i>	130
1.	<i>Cinétique du désassemblage des MTs en présence de Tau</i>	130
2.	<i>Intermédiaire de dépolymérisation en présence de Spastine</i>	138
C.	<i>Conclusions de la 3^e partie</i>	146

DISCUSSION	147
I. DIMERISATION DU DOMAINE DE PROJECTION DE TAU	147
II. ROLE DE LA DIMERISATION DU DOMAINE DE PROJECTION DANS L'ENVIRONNEMENT AXONAL	151
III. ANALYSE DU MODELE DE MUKHOPADHYAY ET HOH	158
IV. MECANISME PROPOSE POUR LA SEPARATION DES AXONES PAR TAU	160
V. IMPORTANCE DE LA DIFFUSION DE TAU SUR LES MTs	163
VI. LIMITES DU MODELE	166
VII. ROLE DE L'EPISSAGE ALTERNATIF DANS LA FORMATION DE CROSS-BRIDGES	168
VIII. IMPACT SUR LE TRANSPORT AXONAL	171
CONCLUSIONS - PERSPECTIVES.....	175
REFERENCES	178
ANNEXES.....	
RESUME/ABSTRACT	

Introduction générale

Avec l'amélioration de la médecine moderne, la durée de vie humaine a considérablement augmenté. Il en est de même pour la prévalence des maladies neurodégénératives liées à l'âge, ce qui fait du vieillissement cérébral un des plus grands défis du XXI^e siècle. La principale cause de démence chez les personnes d'âge moyen et les personnes âgées est la maladie d'Alzheimer (MA) qui affecte environ 44 millions de personnes dans le monde. En France, c'est la maladie neurodégénérative la plus fréquente : selon l'Inserm, on recense environ 900 000 cas aujourd'hui, et ce nombre devrait atteindre 1,3 millions à l'horizon 2020 (soit 1 Français de plus de 65 ans sur 4). A ce jour, les causes de la MA demeurent inconnues. En revanche, l'étude du cerveau des patients atteints a permis de mettre en évidence deux types de lésions caractéristiques qui signent avec certitude le diagnostic de la MA : les plaques amyloïdes et les dégénérescences neurofibrillaires (DNFs). Les premières sont décrites comme étant un dépôt extracellulaire anormal de la protéine Béta amyloïde, tandis que les secondes correspondent à une accumulation neuronale de paires de filaments hélicoïdaux (PHFs) constituées de protéines Tau phosphorylées.

Ces lésions histopathologiques ont été découvertes par Alois Alzheimer en 1906, mais l'isolement des DNFs, et la détermination ultérieure de leur composition protéique, ne l'ont été qu'en 1986 quand il a été montré que les PHFs et Tau ne formaient qu'un^{1,2}. Ce résultat a donné une forte impulsion à l'étude moléculaire de l'étiopathogénie de la MA et d'autres maladies neurodégénératives connexes appelées Tauopathies.

Découverte pour la première fois par Weingarten *et al.* en 1975³, en purifiant de la tubuline, la protéine Tau est principalement exprimée dans les axones, où elle interviendrait dans l'assemblage des monomères de tubuline en microtubules (MTs), la stabilité des MTs et le transport axonal. Par ailleurs, bien qu'elle soit surtout connue comme étant une « protéine associée aux MTs », Tau a de nombreux autres partenaires ce qui complexifie l'étude de ses fonctions. D'autre part, en raison du rôle pivot de Tau dans les Tauopathies, beaucoup d'études se sont portées sur ses fonctions pathologiques et ont ciblé le domaine C-terminal car il serait responsable de l'agrégation de la protéine. De ce fait, les fonctions physiologiques de la partie N-terminale sont encore très peu comprises. C'est pourquoi notre étude s'est concentrée sur le rôle encore controversé de ce domaine

dans l'arrangement spatio-temporel des MTs. Actuellement, selon la littérature, il existe deux modèles d'interaction entre l'extrémité N-terminal de Tau et les MTs dans un cerveau sain :

D'après le modèle le plus connu, appelé « Cross-bridges », le domaine de projection permettrait de favoriser l'association de MTs axonaux en structures régulièrement espacées appelée fagots⁴. Ainsi, Tau formerait des ponts moléculaires entre les MTs adjacents par dimérisation de son extrémité N-terminale. En effet, deux protéines Tau pourraient s'associer en formant un pont électrostatique grâce aux clusters alternés d'acides aminés positifs et négatifs localisés dans ce domaine⁶. Ce paradigme pourrait notamment expliquer l'organisation parallèle des MTs dans les axones, où le maintien de l'architecture est primordial pour les moteurs moléculaires protéiques qui transportent des cargos du corps cellulaire vers les terminaisons axonales (transport antérograde) et inversement (transport rétrograde).

Selon cette théorie, en présence de Tau, les axones seraient constitués de fagots de MTs espacés d'environ 20 nm. Or, lorsque l'on observe des coupes transversales d'axones adultes, on constate que la distance centre à centre entre deux MTs est largement supérieure à 20 nm, ce qui remet en question l'exactitude de ce modèle.

Ainsi, dans la littérature, un second modèle appelé « polymer brush » tente d'expliquer comment grâce à sa partie N-terminale, la protéine Tau permettrait de garder à distance les MTs. En effet, une fois Tau liée aux MTs, son domaine de projection qui est majoritairement désordonné, pourrait exercer des forces répulsives d'origine entropique pour maintenir les MTs éloignés⁵. La protéine agirait alors comme les polymères non structurés utilisés pour stabiliser des suspensions colloïdales. Cependant, ce rôle d'espaceur n'a pas vraiment émergé dans la communauté scientifique.

Initialement, notre objectif principal durant cette étude était d'apporter un regard critique sur les deux hypothèses actuellement présentes dans la littérature afin de déterminer laquelle des deux se rapproche le plus du comportement axonal. Pour ce faire, nous avons utilisé une approche interdisciplinaire (biochimie, biologie cellulaire, biophysique, simulations numériques) afin de statuer sur le fait que le domaine de projection de Tau ait été spécifiquement conçu pour garder les MTs axonaux séparés. Finalement, les résultats obtenus nous ont permis de concevoir un modèle alternatif permettant d'expliquer la séparation des MTs axonaux à de très faibles ratios Tau :Tubuline.

Le travail effectué pourrait à terme apporter un nouvel angle dans la recherche thérapeutique dirigée contre les Tauopathies. En effet, il est fréquent que le transport axonal soit altéré de manière significative chez les personnes malades. Cependant, en dépit de la forte corrélation entre l'apparition de PHFs et la détérioration du transport axonal, la contribution de Tau reste un sujet de discorde. Dès lors, appréhender l'organisation des MTs axonaux s'avère fondamental pour comprendre le rôle que joue la protéine Tau dans le maintien de leur organisation et dans le transport axonal.

Etat de l'art

Cette première section permet d'approfondir les travaux précédemment réalisés dans notre domaine de recherche ce qui permettra au lecteur de mieux appréhender notre étude. Elle est organisée autour de deux parties : la première sur les microtubules, la seconde sur les protéines associées aux microtubules et, en particulier, la protéine Tau.

I. Microtubules : caractérisation générale et fonctions

A. Architecture et fonctions des Microtubules

Les Microtubules (MTs) sont des structures filamenteuses constitutives du cytosquelette qui sont responsables de l'organisation intracellulaire et du maintien de l'intégrité des cellules eucaryotes. Ces structures polaires sont impliquées dans divers types de mouvements cellulaires tels que :

- La motilité des flagelles et des cils,
- Les divisions cellulaires et nucléiques (ségrégation des chromosomes et fuseau mitotique),
- Le transport intracellulaire des organelles et des vésicules.

Les fonctions des MTs étant essentielles pour les cellules eucaryotes, il est important de comprendre leur composition. Les MTs sont des cylindres creux de 25 nm de diamètre, et longs d'une fraction de micromètre à quelques micromètres. Ils sont constitués par l'assemblage hélicoïdal d'une protéine hétérodimérique appelée tubuline^{5,6} qui parcourt la totalité du MT avec un pas d'hélice égal à 12 nm⁷ (Figure I-1). Les tubulines étant des protéines globulaires d'environ 55 kDa avec un point isoélectrique proche de 5,5, ce qui leur confère des propriétés acides.

Il convient également de signaler que la superfamille des tubulines contient 6 isoformes (alpha, beta, gamma, delta, epsilon et zeta), mais que seules les deux premières seront présentées dans ce travail.

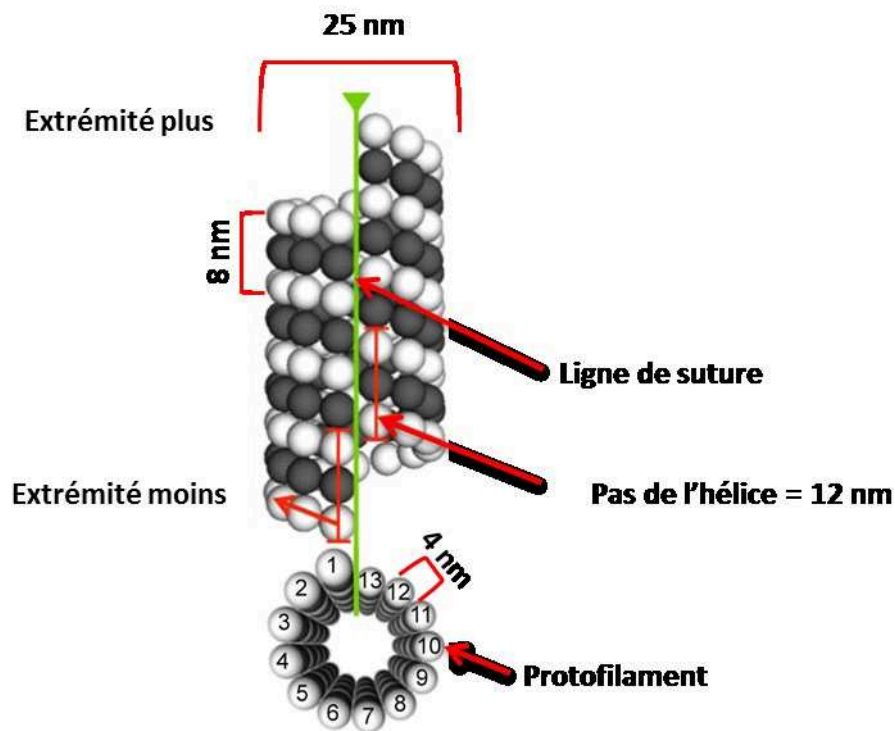


Figure I-1 : Représentation schématique d'un MT et de l'arrangement des dimères de tubuline en protofilaments. Les MTs à 13 protofilaments présentent une irrégularité de l'arrangement des dimères de tubuline appelée ligne de suture (image adaptée de Pilhofer *et al*⁸)

Les dimères de tubuline ont la capacité de s'auto-assembler longitudinalement pour former des protofilaments. En moyenne, le tube creux du MT est formé par treize protofilaments interagissant latéralement (Figure I-1). Ces interactions sont situées au niveau des tubulines de même isotype (α - α et β - β), sauf au niveau de la ligne de suture où il existe un décalage entre les protofilaments ce qui permet des interactions latérales entre des tubulines α et β ^{5,9}. Comme tous les protofilaments ont la même orientation, le MT est polarisé, et expose :

- D'un côté des sous-unités de tubuline β (bout ou extrémité « plus »)
- Et, de l'autre côté des sous-unités de tubuline α (bout ou extrémité « moins »).

Cette différence structurale est aussi une différence fonctionnelle, comme nous le verrons par la suite.

B. Structure atomique de l'hétérodimère de tubuline

Les isoformes α et β ont une forte homologie (près de 50 % de leurs acides aminés sont identiques). Leur structure atomique tridimensionnelle a été résolue en 1998 par cristallographie aux rayons X¹⁰. Ils sont chacun constitués d'un noyau de feuillets β entouré d'hélices α que l'on peut subdiviser en trois domaines visualisables dans la Figure I-2 (pour revue : Downing et Nogales 1998 ; Downing et Nogales 1999^{11,12}) :

- La partie N-terminale forme un pli Rossmann classique de 6 brins β parallèles alternés avec des hélices, ce qui est assez typique pour un site de liaison aux nucléotides,
- Le second domaine est composé d'un mélange de feuillets β à 4 brins et de 3 hélices environnantes,
- La troisième région contient deux hélices antiparallèles en C-terminal qui traversent les deux premiers domaines à la surface externe du MT^{11,12}.

On y retrouve également les sites spécifiques de liaison (Figure I-3) :

- Du GTP qui se fixe en N-terminal avec une affinité de l'ordre de 10 à 100 nM en présence ou en absence de magnésium respectivement (pour revue : Dustin, 1984¹³). Ce site est aussi capable de lier du GDP mais avec une affinité environ trois fois plus faible que pour le GTP¹³.
- Des poisons du groupe des taxanes, qui se lient près de l'interface avec l'homodimère (ex : interface β - β),
- Des poisons du groupe de la colchicine qui se fixent à l'interface intradimérique induisant de ce fait un changement conformationnel¹⁴,
- Des poisons du groupe de la vinblastine qui s'insèrent à la surface du monomère β , près du site du GTP, dans une position qui rompt l'interface interdimérique^{11,12}.

Par ailleurs, l'extrémité C-terminale de la tubuline se caractérisant par l'accumulation de molécules d'acide glutamique, de nombreuses interactions avec des molécules basiques y ont lieu¹⁵. Il est également important de noter que la queue C-terminale, très souvent flottante, expose ses résidus aux modifications post-traductionnelles (comme détaillé ci-après).

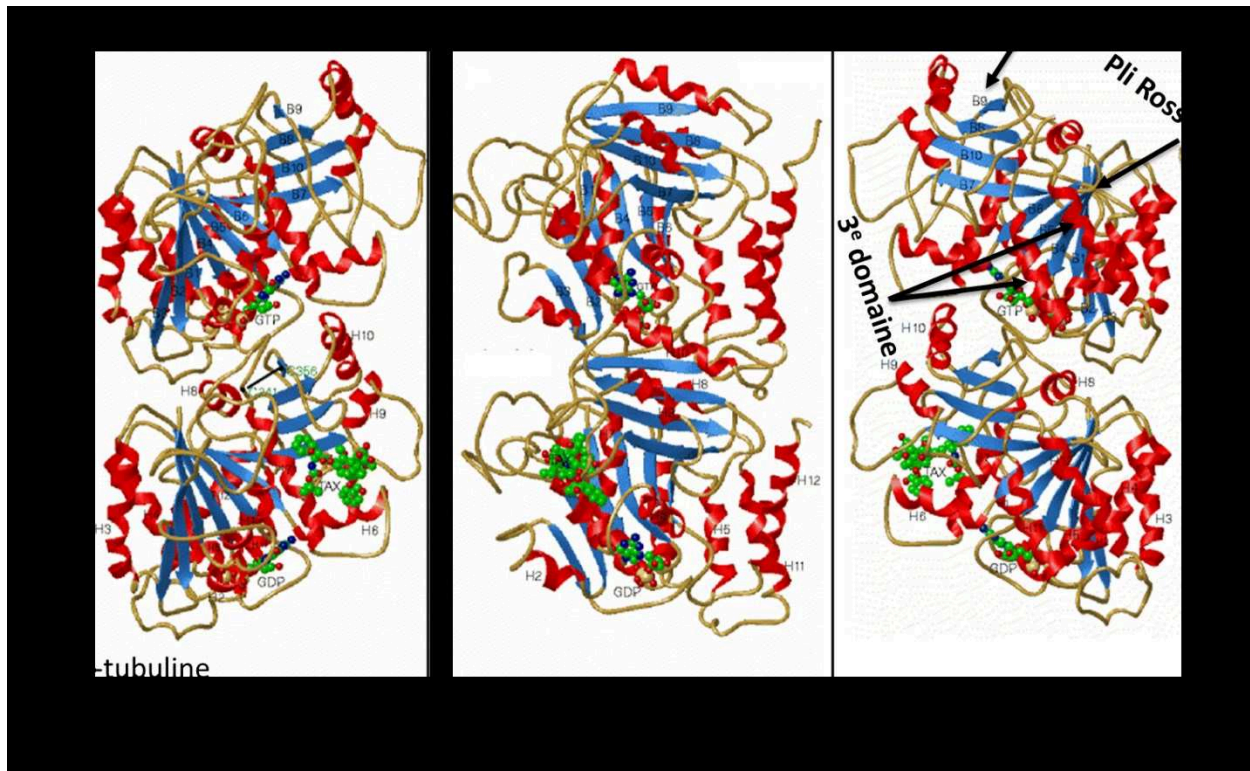


Figure I-2 : Diagramme en ruban de l'hétérodimère d' $\alpha\beta$ -tubuline obtenu par rayon X. Des vues stéréo interne, latérale et externe sont montrées. Les éléments de la structure secondaire ont été coloriés : en rouge pour les hélices, en bleu pour les feuillets et en jaune pour les régions non structurées. Ces structures étant issues d'expériences réalisées sur des feuillets de tubuline stabilisés avec du taxol et induits avec du zinc, on peut aussi voir en vert du taxol, du GTP et du GDP. (image adaptée de Nogales (1998)¹⁰).

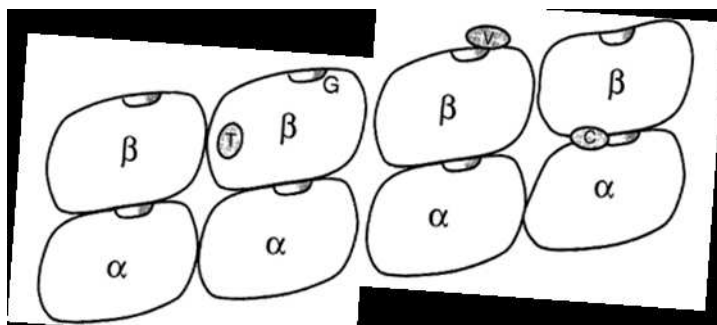


Figure I-3 : Représentation schématique des sites de liaison des drogues se liant aux MTs. Les sites du GTP, du Paclitaxel, de la vinblastine et de la colchicine sont respectivement indiqués par les lettres G, T, V et C. Image issue de Downing et Nogales (1999)^{12,14}.

C. Dynamique *in vitro* des MTs

Les dimères de tubuline possèdent une activité GTPasique qui régule la polymérisation des MTs. Cette dernière s'effectue en deux étapes :

- Une phase de nucléation qui consiste en l'assemblage des hétérodimères α et β en oligomères : elle est définie par le « temps de nucléation », qui selon le modèle de Voter et Erickson¹⁶, représente le temps nécessaire pour atteindre 10 % de la valeur du plateau.
- Une phase d'élongation où des dimères de tubuline sont ajoutés aux extrémités des MTs : elle est définie par la constante de la vitesse d'élongation de pseudo-premier ordre. Ce paramètre peut être obtenu en mesurant la pente de la courbe $y = \log(1 - \frac{I(t)}{I(\infty)})$ en fonction du temps¹⁷ où $I(t)$ représente l'intensité de la lumière diffusée à un temps donné et $I(\infty)$ représente la valeur maximale de l'intensité de la lumière diffusée au plateau. A noter que la concentration en tubuline influence la vitesse d'élongation (plus la concentration est grande, plus la vitesse est élevée).

Ces phases sont suivies par un état stationnaire où les MTs marquent des pauses avant d croître ou de se dépolymériser. Ce stade est appelé « équilibre » car les processus d'élongation et d'effondrement spontané se compensent. *In vitro*, il est également possible d'induire une phase de désassemblage par un choc à froid, des dilutions, ou par l'ajout de calcium ou de drogues (colchicine, nocodazole, vincristine, ...).

Comme mentionné précédemment, les bases moléculaires de cette dynamique sont fortement liées à la structure des MTs. En effet, chaque sous-unité peut se lier à une molécule de GTP, bien que seule la sous-unité β soit capable de l'hydrolyser au niveau d'un site dit échangeable appelé site E¹⁸. Quant à la tubuline α , son site de liaison (non-échangeable) est caché à l'interface intradimérique et est appelé site N. Ainsi, lors de l'assemblage en microtubules, les tubulines β libres hydrolysent une molécule de GTP liée à leur site E pour une molécule de GDP. L'énergie liée à cette réaction n'est pas libérée lors de la polymérisation mais, s'accumule sous forme d'énergie mécanique. En effet, une structure appelée « coiffe de Tubuline-GTP » est formée à l'extrémité « plus ». Après l'hydrolyse du GTP, la formation d'une Tubuline-GDP au sein du MT entraîne un affaiblissement des liaisons entre dimères ce qui favorise les dépolymérisations^{19,20}. Ainsi, à terme, l'hydrolyse du GTP au niveau de la coiffe engendre des épisodes de dépolymérisation rapide (appelés "catastrophes"). Les évènements

inverses sont appelés « sauvetages ». De nombreux travaux ont été consacrés aux facteurs favorisant ou inhibant ce processus. Ils ont permis de mettre en exergue un comportement unique pour un polymère, à savoir alterner de façon autonome entre des phases de croissance et de décroissance. Ce phénomène est appelé « instabilité dynamique »²¹ (Figure I-4).

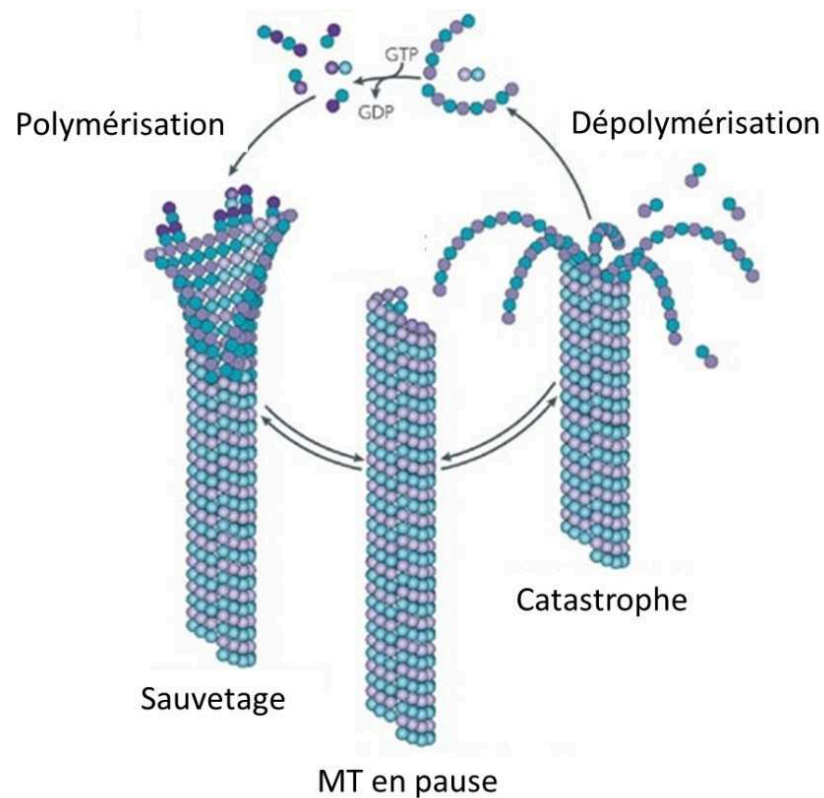


Figure I-4 : MTs soumis à l'instabilité dynamique, image adaptée de (Akhmanova et Steinmetz, 2008)⁷

Plusieurs méthodes permettent l'observation de ces cycles *in vitro* notamment la vidéomicroscopie, ou la turbidimétrie sous réserve de respecter les conditions expérimentales suivantes :

- Une concentration en tubuline supérieure à la concentration critique ou C_c (concentration seuil en-dessous de laquelle il n'y a pas de polymérisation nette. *In vitro*, l'assemblage des MTs commence quand la concentration en dimères atteint la C_c). L'existence d'une concentration critique met en exergue que les phénomènes de nucléation sont des facteurs

limitant pour la formation des MTs. En effet, durant cette phase, les dimères de tubuline forment la base sur laquelle le microtubule croît.

- La présence d'ions Mg^{2+} , qui améliore la capacité du GTP à se lier au site E²²
- La présence de GTP.

- Structures Intermédiaires de dépolymérisation

Il est admis qu'en présence de GTP, la tubuline polymérise sous forme de protofilaments rectilignes. En effet, le GTP impose des contraintes structurales qui obligent les sous-unités à adopter une conformation droite dans le corps du MT. Cependant, en présence de GDP à l'extrémité d'un MT, le protofilament se courbe et le MT « s'épluche » et peut former des anneaux^{23,24} Figure I-5. Des études sur la dépolymérisation des MTs, montrent que l'hydrolyse du GTP affecte l'interface longitudinale du MT, en particulier la force des contacts latéraux, et la structure générale du protofilament²⁵.



Figure I-5 : Processus de désassemblage d'un MT conduisant à la formation d'un anneau de Tubuline-GDP de basse énergie. (a) Perte de la coiffe de tubuline-GTP; (b) épluchage du MT; (c) Intermédiaire de dépolymérisation sous forme d'anneau (image adaptée de Nogales²⁵)

On pense que les phénomènes de dépolymérisation se produisent lors de la perte de la coiffe de tubuline-GTP, responsable des forces latérales stabilisant les MTs, avec pour conséquence l'hydrolyse des sous-unités de GTP^{26,27}. Il existe un modèle selon lequel il y a deux conformations de la tubuline : une conformation pour la tubuline-GTP qui forme des protofilaments droits permettant aux MTs d'être polymérisés, et l'autre conformation pour la tubuline-GDP qui donne naissance à un protofilament courbé ne permettant pas la formation de MTs. A l'intérieur du MT, la conformation

« GTP-like » imposerait une contrainte au MT ce qui permettrait le stockage de l'énergie de l'hydrolyse sous une forme conformationnelle^{23,28}. Un modèle alternatif propose que la conformation de la Tubuline-GTP est également courbée et que l'état du nucléotide affecte principalement les interactions latérales^{26,27}.

Etant constitués de Tubuline-GDP, les anneaux sont incapables d'induire la polymérisation des MTs. En revanche, il a été observé *in vitro* qu'ils étaient capables de déclencher une dépolymérisation massive des MTs en fagots. Il a notamment été montré par Hamon *et al.* (2011)²⁹ qu'en présence de spermine (cation tétravalent présent dans la cellule à une concentration de l'ordre du mM), les fagots de MTs étaient plus sensibles à une brève exposition au froid que des MTs isolés. En effet, un MT en dépolymérisation dans un fagot donne augmente la probabilité que les autres MTs de ce fagot subissent également une catastrophe. La microscopie AFM a permis de montrer que ce comportement collectif des MTs était dû à la stabilisation par la spermine d'anneaux de tubuline-GDP venant polluer les extrémités des MTs à proximité²⁹.

D. Dynamique des MTs dans un contexte cellulaire

In vivo, les MTs sont polymérisés à partir d'un Centre Organisateur des MTs appelé MTOC (ex : centrosomes dans les cellules des eucaryotes supérieurs), à l'exception des flagelles et des cils où les MTs sont nucléés à partir des corps basaux. En général, les extrémités négatives des MTs sont accrochées au MTOC alors que les bouts « plus » irradient dans la cellule. Ces derniers sont beaucoup plus dynamiques, ce qui facilite leurs interactions avec leurs partenaires cellulaires et leur permet de remplir leurs fonctions physiologiques. En effet, dans les cellules, l'organisation spatio-temporelle des MTs est dictée par les besoins cellulaires : trafic intracellulaire, mouvement d'organites, ségrégation des chromosomes ou encore participation à la division cellulaire. Par ailleurs, les MTs peuvent s'assembler en réseaux complexes et réguliers, stables ou transitoires, mais toujours extrêmement reproductibles. Ces réseaux sont essentiellement constitués de MTs organisés en fuseaux dynamiques plus ou moins denses, dispersés dans le cortex cellulaire en interphase où ils jouent un rôle majeur dans la morphogenèse cellulaire. De plus, en fonction des besoins cellulaires, l'orientation des MTs peut être modifiée puisque les MTs sont alignés soit avec une même polarité soit avec une polarité opposée. Un des exemples le plus fascinant de la modulation de la dynamique

des MTs *in vivo* est la mitose. Les MTs quittent l'organisation interphasique où ils ont en général une demi-vie d'environ 10 min, afin de former le fuseau mitotique où ils ont une demi-vie d'environ 30 secondes³⁰. Il est également intéressant de noter que, dans la cellule, les MTs ont une vitesse de polymérisation 10 fois supérieure à celle observée *in vitro* à une concentration de tubuline donnée³⁰. Parallèlement, pendant les phases mitotiques, la fréquence des catastrophes est presque 90 fois supérieure³¹. La différence existante entre les MTs formés avec de la tubuline pure et les MTs *in vivo* peut s'expliquer par l'existence de multiples facteurs cellulaires régulant la dynamique des MTs³²⁻³⁵. Parmi lesquels on retrouve :

- Des protéines stabilisatrices telles que : des protéines se liant aux extrémités des MTs (EBs, CLIPs, ...), et des protéines associées aux MTs (MAP1, MAP2, Tau, ...)
- Des protéines déstabilisatrices telles que certaines kynésines, la stathmine, la katanine, la spastine, ...

1. Encombrement macromoléculaire

L'espace intracellulaire est occupé par une très grande quantité de macromolécules de taille et de forme différentes (protéines, lipides, acides nucléiques). Bien que la concentration de chaque espèce soit faible, la fraction volumique occupée par l'ensemble peut atteindre des valeurs très élevées auquel cas on parle d'environnement cellulaire « encombré » (80 à 400 mg/ml soit 5 ~ 40% v/v)³⁶⁻⁴⁰.

Afin de maintenir son homéostasie, il parfois est indispensable pour la cellule d'ajuster son volume interne par rapport aux macromolécules ce qui tend à générer une force de déplétion à l'origine d'interactions attractives entre grosses particules en présence de plus petites. Décrite pour la première fois théoriquement par Azakura et Oosawa^{41,42}, la déplétion est due à des interactions dites « de volume exclu » qui sont présentes entre deux grosses particules à très courte distance créé par l'absence statistique de petites particules dans cette zone. Dans la cellule, les interactions de volume exclu engendré par l'encombrement macromoléculaire augmentent l'activité thermodynamique et influence l'équilibre et la cinétique de l'association des macromolécules.

De ce fait, un certain nombre de phénomènes d'importance biologique est modifié :

- Au niveau structural, l'encombrement macromoléculaire est fortement impliqué dans la génération de forces de volume exclu et dans le repliement des protéines. De ce fait, certaines protéines non fonctionnelles (voire cytotoxiques) sont formées car mal repliées et non reconnues par leurs cibles⁴³. En outre, il a aussi été proposé que l'encombrement macromoléculaire influence l'organisation du cytoplasme. Par exemple, il a été observé que l'ADN et les filaments du cytosquelette, forment des fagots en présence de macromolécules inertes⁴⁴.
- Au niveau fonctionnel, l'encombrement macromoléculaire modifie la cinétique de nombreux processus enzymatiques. A cela s'ajoute la diminution de la vitesse de diffusion des petites molécules et une forte inhibition de la mobilité des grosses molécules comme les protéines⁴⁵ et les organites⁴⁶.

2. Cas particulier des MTs

La structure rigide et cylindrique des MTs offre une surface large pour les interactions de volume exclu (<5 nm)⁴⁷. En effet, ces interactions interviennent lorsque les molécules présentes dans le cytoplasme sont exclues d'une région autour du MT par encombrement stérique. Toutefois, lorsque les « volumes exclus » autour des MTs se chevauchent, le volume disponible pour les autres molécules augmente, il en est de même pour l'entropie (Figure I-6).

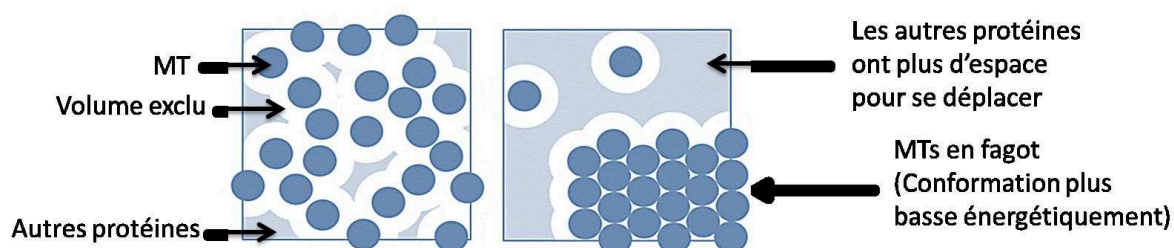


Figure I-6 : Effet de l'encombrement macromoléculaire sur les MTs. Image adaptée de Zhao, Magone, et Schuck (2011)⁴⁸.

De ce fait, dans un environnement encombré, les MTs sont prompts à former des fagots. C'est particulièrement le cas dans les axones où la présence de molécules inertes peut conduire à une attraction forte entre les MTs. En effet, contrairement à l'actine, l'ADN, et beaucoup d'autres filaments biologiques, les MTs offrent une très large surface ce qui leur confère plus de sensibilité vis-à-vis de l'encombrement macromoléculaire et donc des interactions de volume exclu⁴⁷. D'ailleurs, dans les cellules, la stabilisation des MTs avec du taxol est suffisante pour induire des fagots⁴⁹.

L'effet de l'encombrement macromoléculaire sur les MTs peut être mesuré par le biais du stress osmotique. En effet, la concentration des macromolécules dans un compartiment cellulaire est contrôlée par les phénomènes d'osmose. Par définition, lorsque l'osmolarité du fluide extracellulaire est supérieure à celle du fluide intracellulaire, les cellules et les tissus subissent un stress hypertonique. Dans ce cas, les cellules compensent ce déséquilibre en diminuant leur milieu intracellulaire générant ce qui provoque une augmentation de l'encombrement macromoléculaire.

Ainsi, il est possible d'induire la formation de fagots de MTs dans des cellules en augmentant la force ionique du milieu extracellulaire, car les MTs se retrouvent soudainement confinés dans un plus petit espace^{44,50,51}. De même, ces conditions sont reproduites *in vitro* en ajoutant au tampon de polymérisation un faible pourcentage de polymère neutre conduisant à la mise en fagot des MTs.

E. Cas particulier des axones

L'axone est un compartiment neuronal spécialisé dans la transmission de l'information sur des distances potentiellement très longues (elles peuvent dépasser un mètre de long chez les animaux très grands). Par conséquent, il est morphologiquement adapté pour remplir ce rôle. L'un des résultats les plus marquants le concernant a été obtenu en 1981, lorsqu'il a été découvert que les MTs axonaux étaient uniformément orientés avec leurs extrémités « moins » dirigées vers le corps cellulaire, et leurs extrémités « plus » dirigées vers les terminaisons axonales^{52,53}. Par ailleurs, les MTs axonaux se sont révélés être :

- de longueur très variable, puisque certains sont supérieurs à 100 μm de long tandis que d'autres sont plus courts (environ 1 μm)⁵⁴⁻⁵⁷.

- Orientés, sachant que la polarité des MTs axonaux est un prérequis permettant le transport bidirectionnel le long des MTs, comme nous le détaillerons partie I-F.
- Stables comparés aux microtubules d'autres types cellulaires^{58,59,52,53} en partie grâce aux MAPs acquises durant le développement et la maturation des axones⁶⁰.
- Bien séparés, comme on peut le constater par microscopie électronique sur des coupes transversales de neurones matures. En effet, les MTs apparaissent distribués de façon homogène avec une densité comprise entre 15 et 160 MTs/ μm^2 (section axonale).

En outre, il est connu depuis 1964 que dans l'axone les MTs sont libres à leurs extrémités (contrairement aux MTs non neuronaux qui sont rattachés à un centre organisateur)⁶¹⁻⁶³. En l'absence de centre organisateur, l'origine de l'organisation axonale reste à ce jour inconnue.

F. Transport axonal

Le neurone est une cellule très compartimentée, dans laquelle la synthèse des protéines est principalement effectuée dans le corps cellulaire. C'est également une cellule très asymétrique, où le volume de l'axone représente typiquement plusieurs milliers de fois celui du corps cellulaire. Le maintien et le fonctionnement de l'axone et de sa terminaison nécessitent donc un ravitaillement massif en permanence, assuré par le transport axonal antérograde. De plus, les macromolécules qui n'ont pas été sécrétées ou qui ont été captées à la terminaison peuvent être ramenées vers le corps cellulaire par le transport rétrograde. Le transport axonal est donc vital pour le fonctionnement du système nerveux. Les MTs, particulièrement abondants dans les axones, jouent un rôle primordial dans cette communication à double sens entre le corps cellulaire et les terminaisons axonales.

En effet, le transport axonal rapide est orchestré par des ATPases associées aux MTs : les dynéines et les kinésines :

- Le transport antérograde rapide consiste en un déplacement par des kinésines de vésicules formées dans le corps cellulaire à partir de l'appareil de Golgi contenant :
 - o Des protéines synaptiques,
 - o Des enzymes du métabolisme des neurotransmetteurs,
 - o Des mitochondries,
 - o Et certaines des protéines nécessaires au renouvellement de la membrane plasmique et des membranes internes de l'axone.

- Le transport rétrograde rapide permet l'élimination des déchets par la dynéine : il permet le retour des molécules membranaires qui présentent des signes de dégénérescence vers le corps cellulaire afin qu'elles y soient dégradées, voire recyclées.

Un nombre important de maladies neurodégénératives peut être lié à des défauts du transport axonal et à des défaillances propres aux MTs, à leur régulation, ou aux protéines liées au transport axonal.

G. Stabilité des MTs dans l'axone et protéines associées

Une des caractéristiques les plus intéressantes des MTs axonaux est appelée la stabilisation sélective. En effet, il est possible de stabiliser les MTs soit par l'immobilisation de leurs extrémités (par exemple avec des protéines et/ou des structures du cortex cellulaire), ou par l'association de protéines de stabilisation le long des MTs. Bien que beaucoup de protéines semblent stabiliser les MTs *in vitro*, les MAPs responsables de la stabilité des MTs dans les cellules vivantes sont encore mal comprises. Il est important de noter que lorsqu'un MT (ou un de ses domaines) est stable, il peut encore échanger ses sous-unités avec le pool de tubulines solubles, mais cet échange est lent comparé aux épisodes rapides de croissance et de décroissance caractéristique d'un MT dynamiquement instable ou « labile »⁶⁴.

Dans l'axone, les MTs se composent d'un domaine stable vers l'extrémité négative et d'un domaine labile vers l'extrémité positive. Ainsi, la croissance des MTs est probablement limitée à l'allongement des domaines stables existants⁶⁵. La fraction labile comprend 75 % de la masse totale des MTs tandis que la fraction stable ne représente que 25 %⁶⁶. Enfin, plus on se rapproche de l'extrémité distale de

l'axone (près du cône de croissance), plus les MTs sont dynamiques et la région labile est grande⁶⁶ (Pour revue : Baas *et al.* 2016⁶⁶).

L'effet des protéines associées aux MTs dans la stabilité est encore très peu compris. Cependant, de nouvelles études impliquent une nouvelle catégorie de protéines appelée CAMSAPs qui se lient aux bouts « moins » des MTs⁶⁷. On soupçonne que ces protéines bloquent l'addition ou la soustraction de sous-unités de cette extrémité du MT⁶⁸. En effet, l'absence de CAMSAPs dans le neurone résulte dans une diminution du niveau de la stabilité des MTs neuronaux⁶⁹. La stabilisation est également régulée par des protéines de fragmentation des MTs telle que la katanine et la spastine. Ces AATPases formeraient des hexamères à la surface du MT afin de le couper (ou le casser)^{70,71}. Ces protéines de fragmentation seraient régulées par des modifications post-traductionnelles principalement retrouvées dans les domaines labiles^{72,73}. Des modifications de l'activité de la katanine ou de la spastine provoqueraient des défauts moteurs, c'est notamment le cas pour les patients atteints de paraplégie spastique héréditaire dont le gène SPG4 est muté^{74,75}.

H. Modifications post-traductionnelles (MPTs)

La stabilité sélective peut également être suivie expérimentalement grâce à la présence de modifications post-traductionnelles ou MPTs. C'est notamment le cas de la stabilité à froid^{76,77} qui a été associée récemment à la polyamination⁷⁸. Cette MPT est catalysée par la transglutaminase, et produit des protéines plus basiques, alors que la plupart des autres modifications, comme la polyglutamylation, la polyglycylation et la tyrosination, génèrent des chaînes latérales à caractère acide ou neutre de longueurs variables dans l'extrémité C-terminale des tubulines α et β ⁷⁹⁻⁸¹ :

- La glycylation est majoritairement rencontrée sur la tubuline des axonèmes (cils et flagelles)
- La glutamylation est présente dans les cellules neuronales, les centrioles, les axonèmes et sur les MTs du fuseau mitotique⁸². Dans les cellules humaines, les travaux de Lacroix⁷² ont démontré récemment un lien direct entre la présence de longues chaînes latérales de glutamate sur des MTs, et la stimulation de leur fragmentation par la spastine.
- Le cycle de tyrosination – détyrosination de la tubuline α permet de recruter de manière différentielle des moteurs moléculaires et des protéines spécifiques aux bouts « plus »⁸²⁻⁸⁴.

Bien que le C-terminal soit le siège d'un grand nombre de MPTs (à cause de son exposition à la surface du MT), la tubuline peut être sujette à des modifications en amont de cette extrémité, comme la phosphorylation ou le cycle acétylation-déacétylation (Figure I-7). Ces modifications sont conservées au cours de l'évolution et on pense qu'elles agissent individuellement ou en combinaison pour contrôler les mécanismes cellulaires liés aux MTs, par exemple en altérant le recrutement de moteurs moléculaires ou la division cellulaire. Les enzymes responsables de ces modifications sont pour certaines encore mal connues^{82,85}.

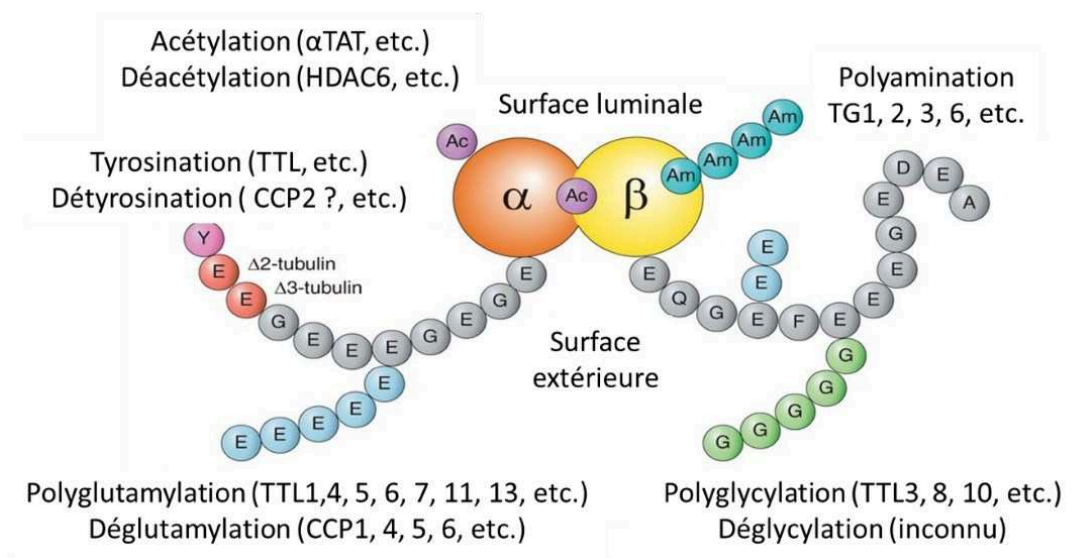


Figure I-7 : Modification post-traductionnelle des MTs axonaux et protéines responsables de chaque modification. Image adaptée de Namba *et al*(2015)⁸⁶.

Enfin, on constate que les MTs labiles sont relativement tyrosinés, déacétylés, et non polyaminés, tandis que la catégorie stable est riche en tubuline acétylée, détyrosinée et non polyaminée. Il a cependant été déterminé que la tyrosination était une conséquence (et non une cause) de la stabilisation des MTs^{87,88}. La fraction stable à froid, quant à elle, est riche en tubuline polyaminée, probablement acétylée et détyrosinée⁶⁶ (Figure I-8).

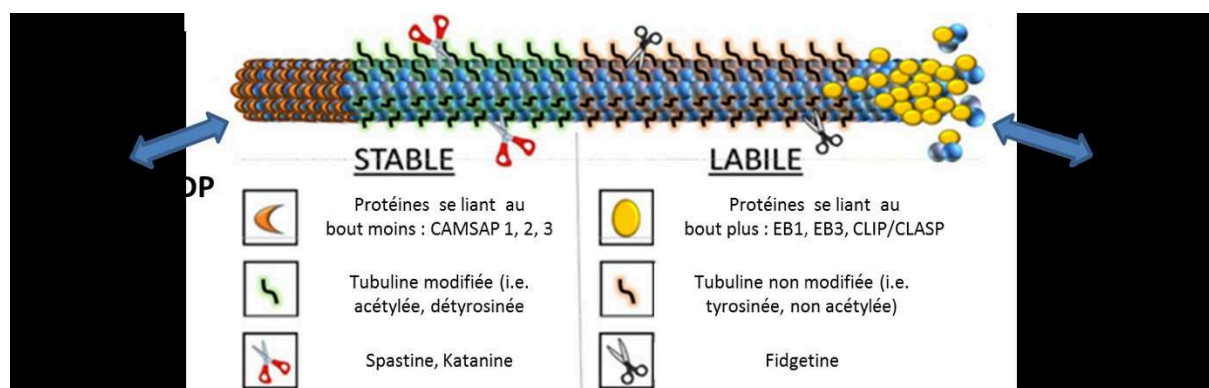


Figure I-8 : Stabilité sélective des MTs axonaux, molécules associées et modifications. Image adaptée de Baas *et al.* 2016⁶⁶.

II. Protéines associées aux MTs dans l'axone : Cas particulier de la protéine Tau

A. Introduction

Les protéines associées aux MTs (MAPs) sont un groupe hétérogène de molécules que l'on peut co-purifier avec la tubuline notamment à partir d'homogénats de cerveaux. Lors de ces co-purifications, on retrouve ~90 % (m/m) de tubuline et ~10 % (m/m) de MAPs⁸⁹. Ces protéines sont réparties selon leur fonction dans différents groupes, dont deux principaux :

- D'une part, les MAPs structurales qui regroupent selon leur homologie les MAPs de Type I (Famille des MAP1) et II (Famille de MAP2, MAP4, et Tau),
- Et d'autre part, les MAPs motrices : la Dynéine et la Kinésine.

Dans ce travail, nous nous intéresserons à la famille des MAPs de type II et, plus particulièrement, à la protéine Tau. Tau est une protéine majoritairement neuronale, bien que son existence dans différents types de cellules gliales ait aussi été reportée dans certaines maladies neurodégénératives^{90,91}.

Bien que Tau soit plutôt liée aux MTs, elle peut également s'associer à la membrane plasmique⁹¹⁻⁹³. Sa présence a aussi été reportée dans le noyau de cellules en prolifération⁹⁴⁻⁹⁶. Quel que soit son partenaire (MTs, membrane, ou noyau), l'interaction de Tau semble être régulée par la phosphorylation (ex : Greenwood et Johnson 1995⁹⁵).

Notre intérêt se portera plus particulièrement sur le rôle physiologique de la protéine Tau dans l'organisation des MTs axonaux.

B. Organisation des gènes de Tau et histoire de leur évolution

- **Analyse Phylogénétique des protéines avec des domaines de liaison aux MTs (MTBDs) homologues à ceux de Tau**

Les MAPs, quelles qu'elles soient, n'ont pas été épargnées par l'histoire de l'évolution des eucaryotes. Cependant, ici nous nous concentrerons sur la famille de Tau (soit les MAPs structurales de type II). Comme il l'a été notifié précédemment, chez les mammifères, cette famille est constituée des protéines neuronales MAP2 et de Tau, et de la protéine non neuronale MAP4. L'origine des deux premiers remonte aux premiers vertébrés (Agnathes) tandis que MAP4 dérive d'un ancêtre de métazoaires non-vertébrés. Ainsi, il semble également que MAP2 et Tau partagent un ancêtre commun plus récent que MAP4⁹⁷ (Figure I-9).

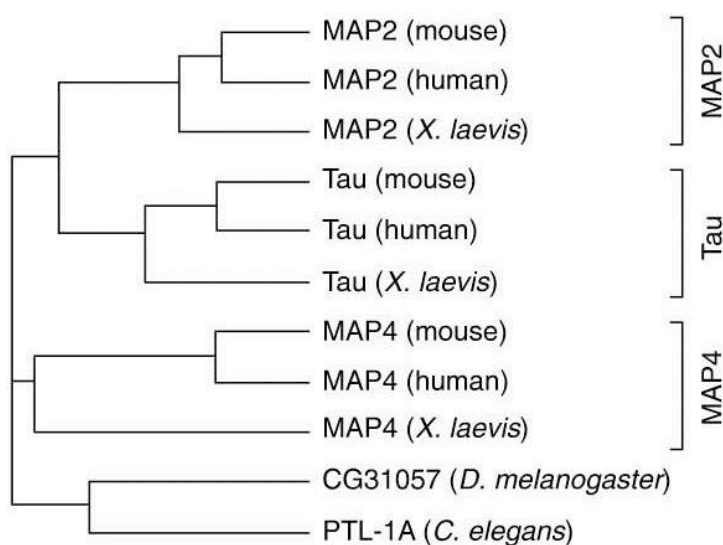


Figure I-9 : Reconstruction phylogénétique partielle de la famille de MAPT/MAP2/MAP4. Image issue de l'article de Dehmelt et Halpain (2005)⁹⁸.

Les trois membres de cette famille ont un domaine carboxy-terminal contenant des séquences “KxGS” répétées dans chacun de leurs domaines de liaison aux MTs (MTBDs) en région C-terminal⁹⁹. Par ailleurs, ce motif est fortement conservé chez les protéines orthologues à travers les espèces exprimant ces MAPs (Figure I-10). En effet, des protéines proches de la protéine Tau ont été trouvées dans les eucaryotes inférieurs comme *Caenorhabditis elegans*¹⁰⁰, *Drosophila*¹⁰¹, les poissons rouges¹⁰², et l’ouaouaron¹⁰³. Ces séquences protéiques maintenues par l’évolution, malgré la spéciation, implique que le gène de Tau lui-même est hautement conservé. Lorsque ce gène est muté dans une région hautement conservée, il est transcrit en une protéine non viable, ou une forme qui est éliminée par la sélection naturelle.

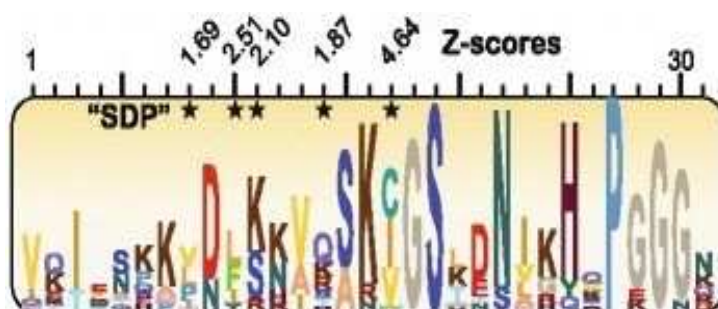


Figure I-10 : Modèle de Markov caché suivant un processus de poisson (MMCP) réalisé sur 1200 MTBDs de la famille de protéines MAPs de type II. Ce modèle permet de prédire la variance intraspécifique d’une séquence. Ici, est représentée la probabilité d’obtenir un acide aminé à une position donnée dans la séquence. Plus la lettre est haute, plus l’a. a. est fréquent à cette position dans la séquence. On voit notamment que la séquence KxGS est très conservée au sein des espèces. Image issue de l’article de Sündermann, Fernandez, et Morgan (2016)⁹⁷.

Mis à part l’homologie de leur séquence primaire, Tau, MAP2 et MAP4 ont comme point commun leur activité de stabilisation et d’organisation des MTs. Elles sont également toutes exprimées sous plusieurs isoformes, dont la longueur du domaine N-terminal et le nombre de répétitions du domaine de liaison aux MTs varient^{98,104–106}. Elles sont cependant, différemment compartimentées.

En effet, bien que toutes les deux soient des protéines neuronales, MAP2 et Tau : MAP2 est somato-dendritique tandis que Tau prédomine dans les axones. MAP4 quant à elle, est présente dans de nombreux tissus différents, mais est généralement absente des neurones.

Par ailleurs, Tau partage également des séquences avec des membres externes à sa sous-famille de MAPs, par exemple :

- La séquence PGGGSVQIY à partir du résidu 301 au résidu 310 (en prenant comme référence l'isoforme le plus long du système nerveux central) qui peut être retrouvée sur les nucléosidases,
- Les résidus 134–142, (TGSDDKKAK) dans la β -transductine,
- Ou, de façon moins homologue, la séquence VVSXXXS de la sous-unité β de la déhydrogénase du pyruvate avec les résidus 398–404 et la séquence YSSXXXS des récepteurs de l'adénosine de type 2 avec les résidus 197–202.

C. Isoformes de Tau présents dans le système nerveux central (SNC).

Dans leur article de 1988, Goedert et ses collaborateurs ont mentionné l'identification d'un isoforme de Tau jusqu'alors inconnu¹⁰⁷. Cette nouvelle protéine différait de la forme connue d'une variation de séquence dans le C-terminal. Il a donc été suggéré que ce second isoforme soit issu de l'épissage alternatif de l'ARNm de Tau¹⁰⁷. Cette deuxième forme est identique à la première, à l'exception d'un insert supplémentaire de 31 acides aminés dans cette région. Après le séquençage des ADNc, il a été montré que le domaine supplémentaire était codé par un exon séparé, aujourd'hui connu comme étant l'exon 10.

Ce travail a permis la découverte de la coexistence d'au moins deux types d'isoformes de Tau dans le cerveau humain, avec trois répétitions (Tau 3R) ou quatre répétitions (Tau 4R) d'un motif de liaison à la tubuline conservée maintenant appelé « MT binding domain » ou MTBD¹⁰⁸.

Depuis, le séquençage d'un grand nombre d'ADNc a révélé la présence d'autres isoformes de la protéine Tau :

- Avec deux inserts dans la région N-terminale appelés E2 (29 aa) et E3 (59 aa) en raison d'un épissage alternatif d'exons 2 et 3,
- En combinaison avec les isoformes décrits précédemment avec trois et quatre répétitions de MTBD (Figure I-11).

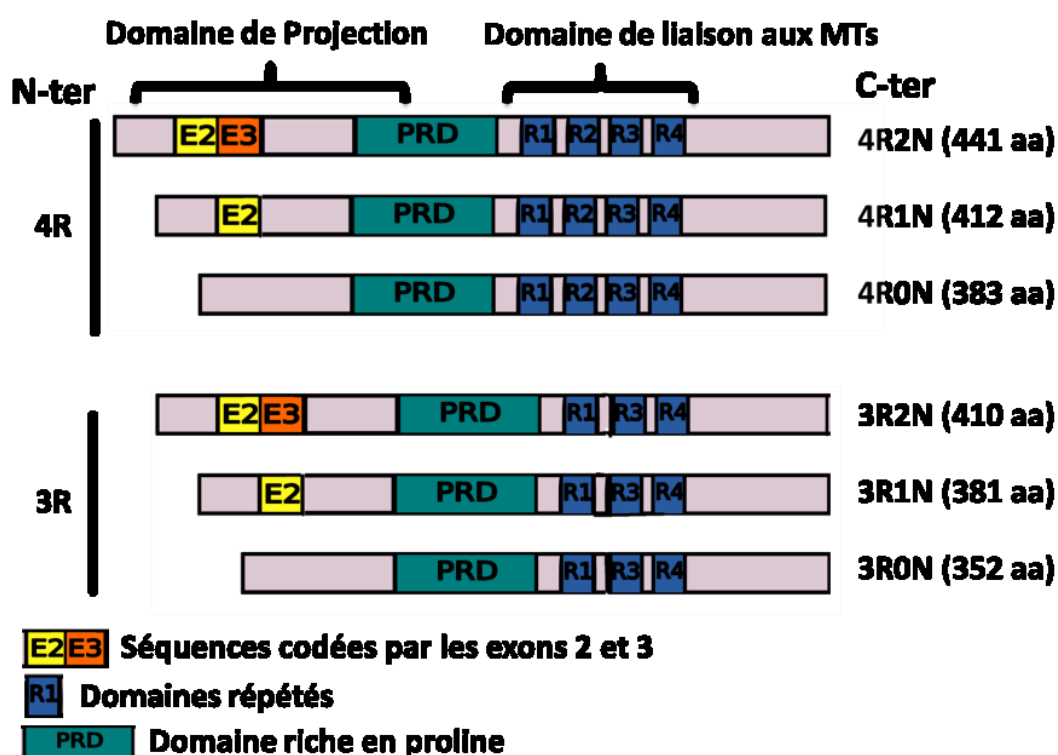


Figure I-11 : Représentation schématique des isoformes de Tau présents dans le cerveau humain adulte.

Aujourd'hui est connu un total de six isoformes de Tau dans le système nerveux central (SNC) allant de 352 à 441 acides aminés¹⁰⁸ qui portent le nom de xNyR avec :

- X pour le nombre d'inserts inclus dans le domaine N-terminal dit « de projection » qui va du résidu M1 au résidu P172 sur Tau 2N.
- Et y pour le nombre de domaines MTBD.

Le cerveau humain adulte exprime les isoformes 4R et 3R avec un rapport égal à 1, tandis que les quantités relatives des isoformes N0, N1 et N2 sont 37 %, 54 % et 9 %, respectivement^{109,110}. De plus, au cours du développement du fœtus, le cerveau exprime l'isoforme le plus court appelé protéine tau fœtale ou NOR3 (352 acides aminés avec un poids moléculaire de 45 kDa) dans des quantités très importantes¹⁰⁹. Il faut également noter qu'un isoforme plus long communément appelé « Big Tau » (758 aa, 110 KD), existe au niveau du système nerveux périphérique et comprend l'exon 4A en supplément¹¹¹⁻¹¹³.

La fonction de chaque isoforme n'est pas encore bien identifiée, cependant il est maintenant connu que les formes 4R ont une affinité aux MTs supérieure aux formes 3R¹¹⁴. Par exemple, les formes 2N4R et 2N3R ont respectivement des $Kd = 0,075 \mu\text{M}$ et de $0,450 \mu\text{M}$ ¹¹⁵. Par ailleurs, le rôle des domaines codés par les exons 2 et 3 est moins connu. Ils ont cependant été décrits comme étant critique pour le maintien du diamètre axonal, mais aussi pour les interactions de Tau avec la membrane plasmique¹¹⁶. La séquence codée par l'exon 3 n'apparaît jamais indépendamment de celle de l'exon 2, seul ce dernier peut apparaître isolé dans le domaine N-terminal.

Les différents isoformes de la protéine Tau sont codés par un gène unique appelé MAPT (MT associated protein Tau), qui est situé sur le chromosome 17q21¹¹⁷. Constitué de 13 exons, MAPT est supérieur à 50 kb et permet l'expression de la protéine Tau dans les neurones (où elle se trouve généralement), mais aussi :

- Dans les astrocytes,
- Les oligodendrocytes^{118,119} où elle participe au processus de myélinisation¹²⁰,
- Et dans les muscles¹²¹.

Aujourd'hui encore, très peu de données sont disponibles sur les différences structurales et fonctionnelles entre isoformes malgré les efforts considérables qui ont été menés pour comprendre la relation entre structure, fonction, et nature biochimique de l'interaction Tau-MTs. Cependant, la régulation très finement contrôlée de l'épissage alternatif amène la possibilité que chaque forme de Tau possède certaines capacités fonctionnelles distinctes. En accord avec cette hypothèse, des modifications de la régulation du gène MAPT perturbent l'équilibre normal entre l'expression des formes 3R et 4R et conduisent à des maladies neurodégénératives, notamment à la démence fronto-temporale liée au chromosome 17 avec parkinsonisme^{104,122-125}.

D. Structure, fonction et charge des domaines de Tau

1. Structure et fonction du domaine C-terminal

Les domaines de liaison aux MTs contiennent 3 ou 4 répétitions très similaires mais non identiques de 31 ou 32 résidus. Chaque répétition peut être subdivisée en 2 parties :

- Une séquence composée de 18 résidus qui contient la région minimale capable de se lier à la tubuline,
- Une seconde séquence, appelée inter-répétition, qui est un domaine moins conservé de 13 à 14 résidus.

A part la liaison aux MTs, les MTBD ont également pour fonction de promouvoir l'assemblage des MTs¹²⁶. D'ailleurs, parmi les régions R1 à R4, les séquences les plus efficaces pour se lier à la tubuline sont contenues par R1 et R2¹²⁷. Le développement joue aussi un rôle dans la capacité de Tau à promouvoir l'assemblage des MTs puisque les isoformes 4R adultes sont presque 40 fois plus efficaces que l'isoforme 3Rfœtal¹²⁸. A part les MTs, ces domaines répétés se lient aussi à la déacétylase de la tubuline (HDAC6)¹²⁹, et à l'apolipoprotéine E (apoE)¹³⁰.

Enfin, le MTBD contient PHF6 (VQIVYK) et PHF6* (VQIINK), des séquences critiques qui peuvent s'avérer nécessaires pour la formation de la structure en feuillets à l'origine de l'agrégation de Tau et des inclusions pathologiques^{131,132}.

2. Structure et fonction du domaine N-terminal

Le domaine de projection est appelé ainsi parce que son ultrastructure apparaît comme « une projection filamenteuse » émanant du MT. Au cours des dernières décades, plusieurs partenaires lui ont été associés dont des protéines du cytosquelette, des protéines de la signalisation cellulaire et beaucoup d'autres (pour revue, voir Morris *et al.* 2011¹³³) (Tableau I-1). Du fait de ce grand nombre de partenaires, des rôles très distincts ont été attribués au domaine N-terminal. Ainsi, au fil du

temps, il est devenu une des cibles thérapeutiques potentielles des Tauopathies¹³⁴ notamment pour les symptômes liés à la plasticité synaptique.

Avec un poids moléculaire de presque 18 KDa, le domaine de projection représente environ 40 % de la protéine. De plus, en considérant que la longueur étendue théorique d'un acide aminé est de 0,4 nm et en estimant qu'il s'arrête à P172, une fois étiré, il mesure environ 69 nm. Il est connu pour être non structuré, très flexible et hydrophile puisque son index GRAVY est égal à -1,077. L'index GRAVY est une unité arbitraire basé sur le pourcentage d'acides aminés hydrophobes dans la protéine, en dessous de 0 la protéine est hydrophile.

Partenaires de Tau	Fonction du partenaire
PLC γ	Clivage des lipides de la signalisation
Fyn	Kinase de la famille des Src
Grb2	Liée au facteur de croissance
Fgr	Kinase de la famille des Src
Lck	Kinase de la famille des Src
P85 α	Sous-unité permettant la régulation du PI3K
cSrc	Kinase de la famille des Src

Tableau I-1 : Liste non exhaustive des partenaires de Tau se liant au domaine N-terminal via son domaine SH3 (Pour revue : Reynolds et al 2008¹³⁵).

3. Charges de la protéine Tau

En considérant la structure primaire de Tau, la séquence du polypeptide codée par les exons 2 et 3 ajoute de l'acidité à la protéine Tau, alors que celle de l'exon 10 code pour des acides aminés chargés

positivement et ajoute au caractère basique de la protéine. Plus généralement, la région N-terminal a un pI de 3,8. Elle est suivie par le domaine riche en prolines, qui a un pI de 11,4, et la région C-terminal qui est également positivement chargée avec un pI de 10,8. Ainsi, Tau peut être considérée comme un dipôle avec deux domaines de charges opposées, modulables par des modifications post-traductionnelles (Figure I-12). Ainsi, dans son domaine de projection (M1 à P172) elle est composée d'un cluster de 34 résidus chargés négativement (Asp + Glu) et d'un cluster de 17 résidus chargés positivement (Arg + Lys).

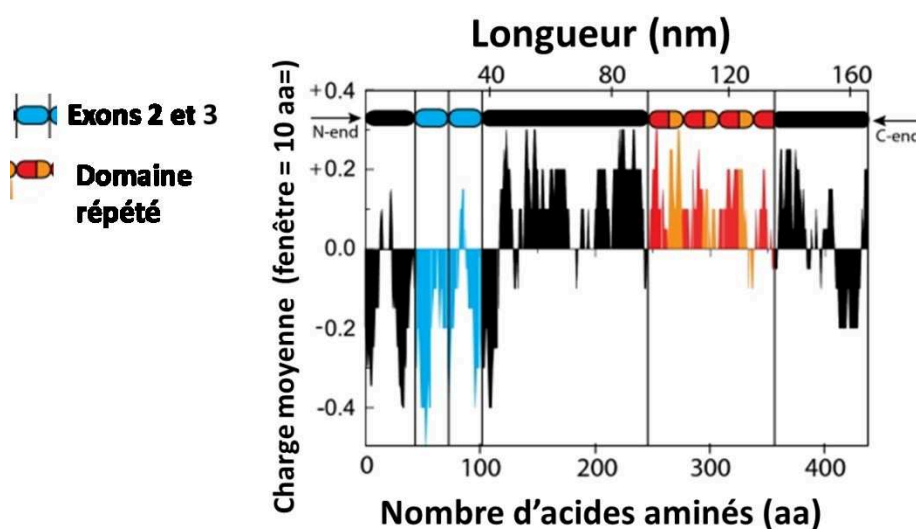


Figure I-12 : Diagramme de la distribution des charges de Tau 4R2N (fenêtre de 10 aa). Image adaptée de Rosenberg *et al.* (2008)⁴.

De par leurs extrémités C-terminal, les MTs sont très négatifs, les charges positives du MTBD permettent donc à la protéine Tau de s'associer à eux par l'intermédiaire de liaisons électrostatiques. Par ailleurs, le domaine N-terminal, grâce à ses clusters alternativement chargés aurait la capacité de dimériser comme ceci sera expliqué partie I-E-1.

E. Fonctions axonales de Tau

Il est connu depuis 1975 que lorsque Tau est ancrée sur les MTs *in vitro*, elle favorise leur assemblage et les stabilise³. Bien que, pour certains, ce résultat soit également valable *in vivo*, cette assertion est encore très controversée¹³⁶. En effet, dans les cultures cellulaires, Tau colocalise avec les MTs les plus dynamiques et avec ceux qui sont les plus sensibles aux dépolymérisations induites à l'aide de drogues¹³⁷. Ainsi, dans les axones sains, la protéine Tau présente un gradient de concentration sur l'axe proximo-distal où la quantité maximale de protéine est retrouvée près de la synapse¹³⁷⁻¹³⁹. De plus, parmi toute la population des MTs neuronaux, la vitesse du turnover de la fraction des MTs associés à Tau est la plus élevée, à la fois dans les cultures de neurones primaires de rats et *in vivo*, dans des hippocampes de souris¹⁴⁰. Ces résultats remettent en question le rôle considéré comme critique de la protéine Tau dans la stabilisation des MTs *in vivo*. D'autant plus que l'inactivation du gène MAPT n'est pas mortelle pour des neurones primaires en culture et ne diminue ni le nombre de MTs, ni leur état de polymérisation^{136,141}, même si des phénomènes de compensation peuvent avoir lieu.

In vivo, les fonctions de la protéine Tau semblent chevaucher celles de MAP1B, une autre MAP trouvée dans les axones. En effet, l'ablation complète de Tau chez la souris n'altère pas significativement la longévité ou les fonctions cérébrales les plus critiques. Néanmoins, lorsque MAP1B et Tau sont tous les deux invalidés, on observe des cerveaux dysgénésiques et une mortalité prématurée¹⁴². En effet, la sévérité de la dysgénie du cerveau pour les souris double KO entraîne leur mort dans le premier mois de vie. Il paraît donc raisonnable de supposer que certaines fonctions de MAP1B et de Tau se chevauchent et sont essentielles pour la maturation cérébrale¹⁴². Il est cependant impossible de tirer des conclusions définitives à partir du phénotype double KO, en raison du début prématuré de la létalité.

A part la régulation de la dynamique des MTs, des données génétiques montrent que le gène MAPT est requis pour un développement normal de cerveau humain puisque des délétions du locus 17q21.3 sont associées à des problèmes de développement sévère chez l'enfant^{143,144}. De surcroît, l'inactivation de Tau dans des cultures de neurones de rat inhiberait la formation de neurites¹⁴⁵, tandis que sa surexpression les favorise, et cela même dans les cellules non neuronales^{146,147}. Cependant, ces fonctions doivent être confirmées par d'autres expériences, car les résultats obtenus sont controversés : dans certains cas les neurites sont inhibés et leur maturation est ralentie¹⁴⁸ tandis que sur d'autres lignées de neurones primaires de souris MAPT-KO ces résultats ne sont pas retrouvés¹⁴⁹.

Par ailleurs, il a été constaté sur des souris atteintes par la maladie d'Alzheimer que les neurones en dégénérescence présentaient plusieurs symptômes indiquant une altération du transport intracellulaire¹⁵⁰⁻¹⁵³. Compte tenu de ces observations, et du rôle central de la protéine Tau dans la maladie d'Alzheimer, plusieurs études sur les effets de la protéine monomérique ont été menées afin de déterminer si le rôle de Tau était de réguler le transport axonal. Cependant, le rôle physiologique de Tau en la matière ne semble pas évident. Car, bien que l'inactivation de Tau n'altère pas le transport axonal dans les cultures primaires de neurones¹⁵⁴ ou *in vivo*¹⁵⁵, de nombreux rapports montrant une corrélation positive entre le transport axonal et Tau sont publiés¹⁵⁶⁻¹⁵⁸.

Une autre proposition quant au rôle physiologique de Tau est que sa partie N-terminale permettrait de réguler l'espacement inter-MT¹⁵⁹⁻¹⁶¹. Dès 1992, des études menées sur des cellules d'insectes ont révélé que lorsque Tau ou MAP2 étaient exprimées, la distance inter-MT reflétait les caractéristiques de l'espacement des MTS dans les compartiments axonaux et dendritiques¹⁴⁷. Puis, en 1994, Frappier *et al* a permis de mettre en évidence le rôle du domaine de projection dans ce phénomène en surexprimant dans des cellules d'insectes Sf9 des plasmides¹⁶² :

- De Big Tau,
- D'un des 6 isoformes du système nerveux central,
- D'une forme tronquée de Tau sans la partie N-terminale.

Les « neurites » ainsi formés ont été coupés transversalement ce qui a permis l'observation des MTs par microscopie électronique et la mesure de la distance inter-MT entre MTs adjacents (centre à centre). Les résultats montrent que ces neurites sont composés par des longs fagots de MTs parallèles pour toutes les conditions. Cependant, les distances inter-MTs obtenues avec Big Tau sont supérieures à celle obtenues avec le Tau de poids moléculaire moyen. En accord avec les résultats précédents, les distances inter-MTs en présence de l'isoforme tronqué sont les plus courts¹⁶². De plus, les espacements reportés par Frappier *et al*¹⁶² avec Tau sont inférieurs à ceux reportés par Chen *et al*¹⁴⁷ avec MAP2 dans les mêmes conditions expérimentales. Ces résultats suggèrent que l'espacement centre à centre de deux MTs adjacents dans les axones centraux (Tau) devrait être inférieur à celui de deux MTs du système périphérique (Big Tau), qui à son tour devrait être inférieur à celui de deux MTs dans les dendrites (MAP2). Ces expériences confirment les observations faites par Black *et al*¹⁶³ qui montrent *in vitro* que la distance centre à centre des MTs en présence de MAP2

est supérieure à celle constatée avec Tau¹⁶³. Ainsi, l'espacement inter-MT pourrait être dépendant de l'inclusion des exons 2, 3 et 4A.

Ces résultats suggèrent que les domaines de projection des MAPs de la famille de Tau sont responsables de la distance inter-MTs. Bien que ce soit communément admis, la manière dont cette distance serait régulée est toujours controversée. Il existe notamment deux modèles antagonistes quant au rôle de Tau dans l'espacement des MTs axonaux :

- Selon le modèle du « Cross-bridge », les projections N-terminal de Tau dimérisent par des interactions électrostatiques et permettent la formation de fagots de MTs,
- A contrario, selon le modèle du « Polymer brush », les domaines de projection de Tau bougent par effet thermique et écartent les MTs (répulsion entropique). Le domaine de projection de Tau fixerait alors la distance de séparation minimale entre les MTs.

1. Modèle du cross-bridge

Bien qu'il soit généralement admis que Tau interagisse avec les MTs isolés, les interactions inter-MTs inhérentes à Tau restent incertaines. Néanmoins, il a été observé par microscopie électronique des structures pouvant s'apparenter à des liaisons transversales sur des neurites obtenus en surexprimant Tau sur des cellules d'insectes Sf9¹⁴⁷ (Figure I-13).

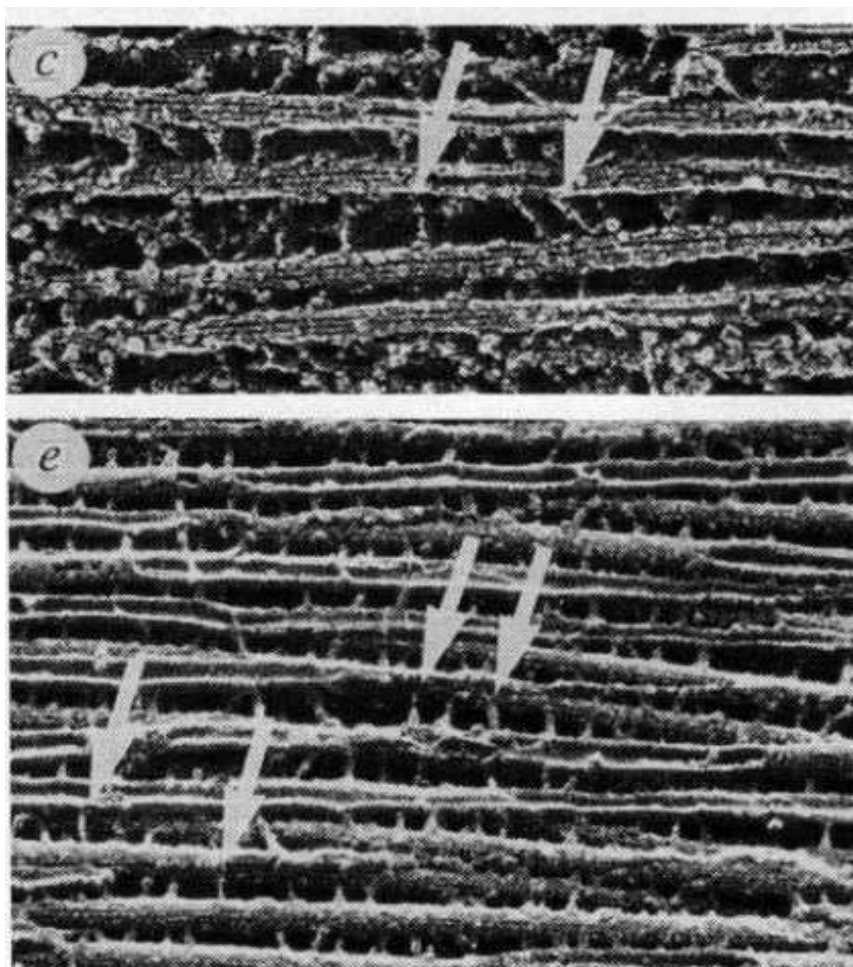


Figure I-13 : Protéine supposée être Tau formant des ponts électrostatiques transversaux sur des MTs obtenus c) après transfection de cellules Sf9 ou e) par copolymérisation *in vitro*. Les flèches mettent en exergue les cross-bridges putatifs. Image de Chen *et al.* 1992¹⁴⁷.

Aujourd'hui, Il est considéré que ces structures sont des ponts électrostatiques formés par dimérisation de 2 protéines Tau localisées sur des MTs adjacents. En effet, en accord avec cette hypothèse la partie N-terminale de Tau est composée par des clusters alternatifs de résidus de charges opposés qui pourraient former un zipper électrostatique antiparallèle⁴ (Figure I-12). De plus, cette assertion est corroborée par le fait que la distance inter-MT observée par microscopie électronique correspond à la taille de la partie N-terminale¹⁴⁷ (Figure I-14).

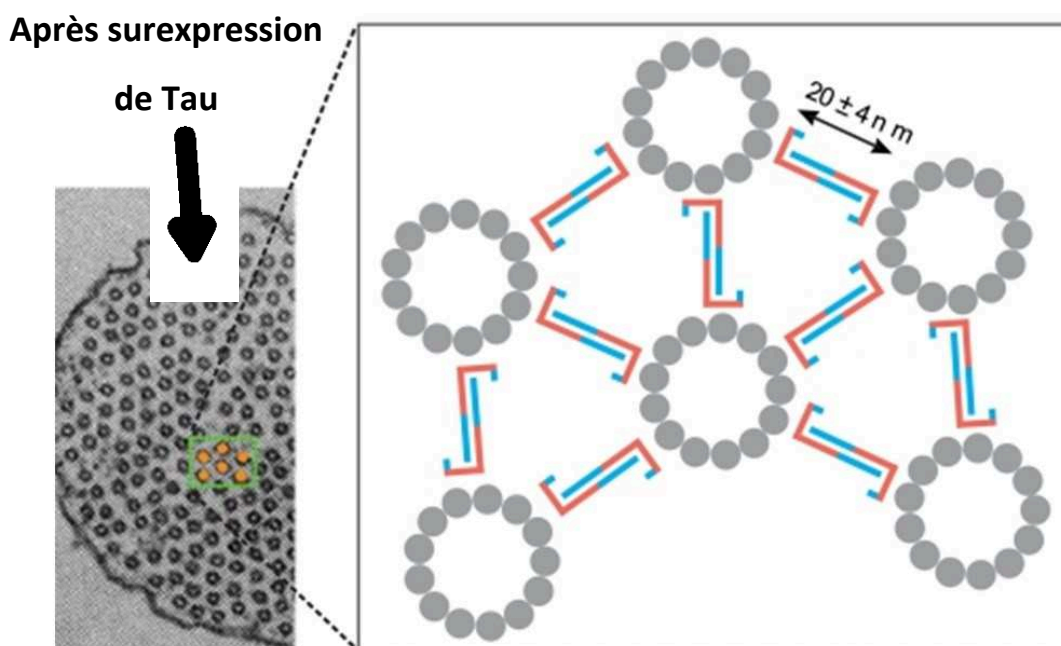


Figure I-14 : Homodimérisation des domaines de Tau et formation de fagots de MT après surexpression de Tau dans les neurones selon le modèle du cross-bridge. Image adaptée de Rosenberg *et al.* (2008)⁴.

Par ailleurs, l'existence de cross-bridges est également utilisée pour expliquer la mise en fagot des MTs observée en présence de Tau dans la littérature. En effet, il a été reporté de nombreuses fois que lorsque Tau était surexprimée dans des cellules, neuronales ou non, elle agissait comme un régulateur positif de la mise en fagot des MTs^{4,164-166}.

2. Modèle du polymer Brush

Compte tenu du fait que les conditions expérimentales permettant l'obtention des résultats précédents sont éloignées des conditions physiologiques (surexpression de Tau), il est pertinent de se questionner quant à la prévalence de cet effet dans des conditions normales (sans surexpression). D'autant que sur des coupes d'axones matures observées par microscopie électronique, les MTs apparaissent séparés de façon homogène avec une distance inter-MTs supérieure aux 20 nm obtenus sur des fagots formés en présence de Tau¹⁶⁷⁻¹⁷¹. Par exemple, selon Yamada, Spooner, et Wessells (1971)¹⁶⁸, la distance entre un MT et son plus proche voisin dans un axone mature est de $750 \text{ \AA} \pm 170 \text{ \AA}$ (Figure I-15). Cette étude montre également que les MTs sont espacés de façon régulière (Figure I-16).

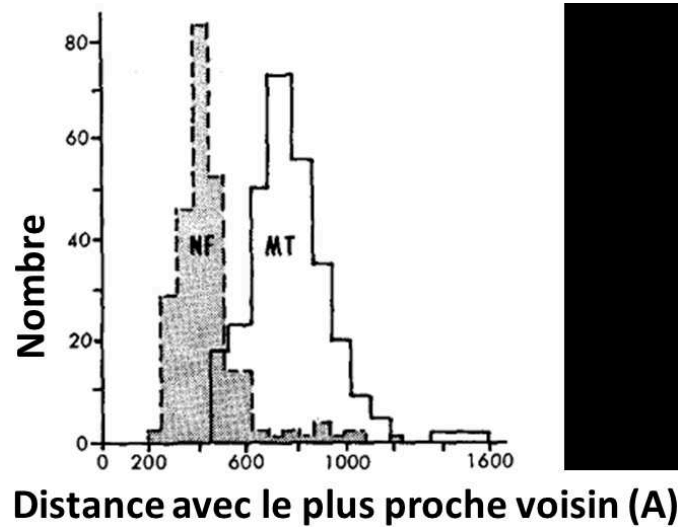


Figure I-15 : Distribution de la distance avec le plus proche voisin pour les neurofilaments(NF) et les microtubules (MT) tirée de l'article de Yamada, Spooner, et Wessells¹⁶⁸.

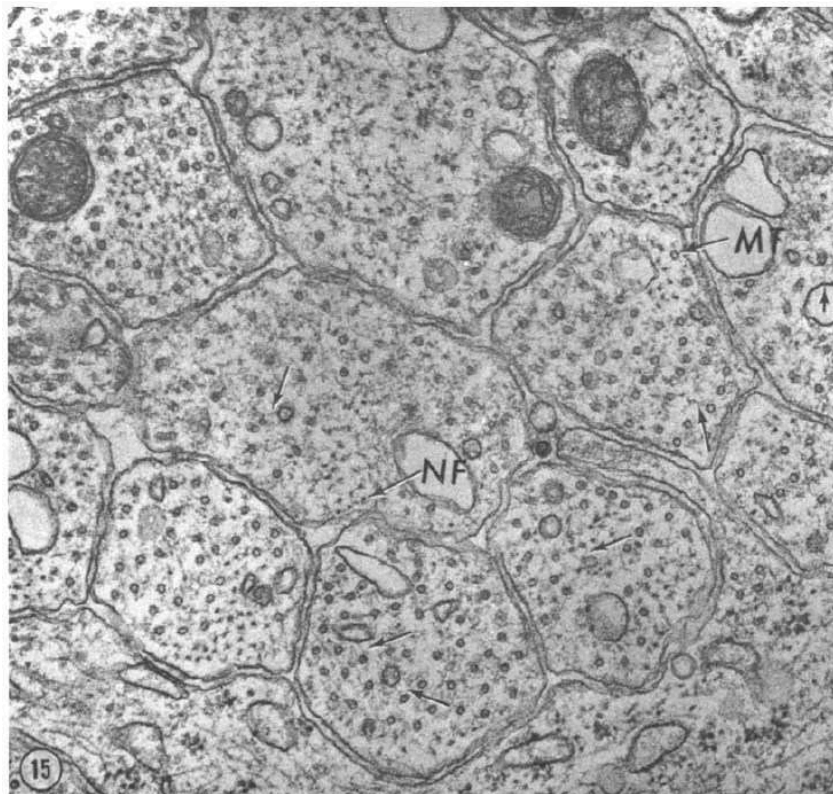


Figure I-16 : Exemple de coupes transversales d'axone mature qui a permis la quantification présentée Figure I-15. On y voit que les MTs sont espacés et distribués de façon homogène. Image tirée de l'article de Yamada, Spooner, et Wessells (1971)¹⁶⁸.

Plus récemment, une étude chez la drosophile montre que le diamètre de l'axone et l'espacement des MTs axonaux sont contrôlés par Futsch et Ank2 (analogue de MAP1B et MAP2). En effet, en l'absence de ces protéines une réduction dramatique de l'espacement inter-MTs a été observée (Figure I-17).

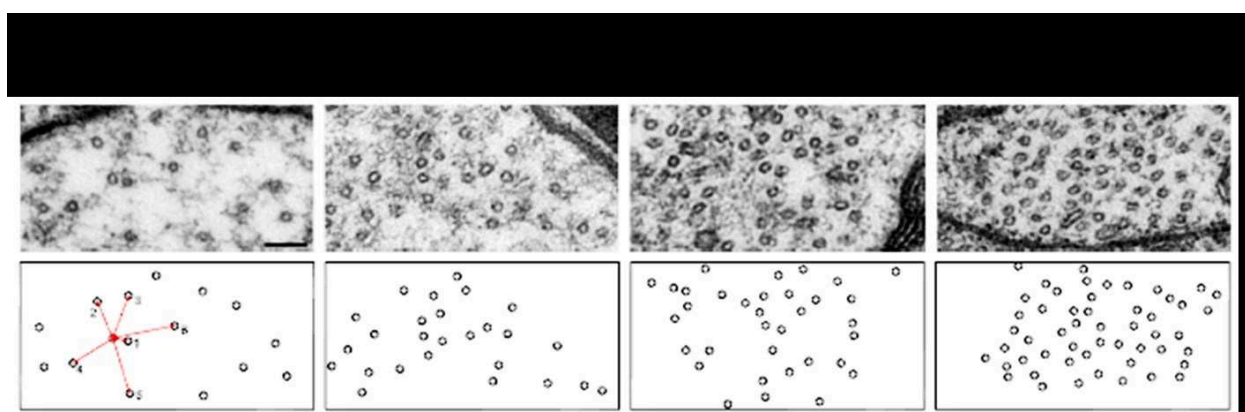


Figure I-17 : Ultrastructure et organisation des MTs dans des coupes transversales d'axones de drosophiles normales ou mutées. Images tirées de l'article de Stephan *et al.* (2015)¹⁷¹.

Bien que des fagots de MTs puissent être présents dans le cône d'émergence¹⁷², ces résultats indiquent que ce n'est généralement pas le cas dans les axones matures, où Tau est préférentiellement située.

Au contraire, Tau pourrait comme Ank2 et Futsch moduler le diamètre axonal et la distance de séparation des MTs axonaux. Ainsi selon Mukhopadhyay *et al*, la partie N-terminale de Tau, non structurée, pourrait agir comme un « polymer brush » et créer une répulsion d'origine entropique entre MTs basée sur les mouvements thermiques^{173,174}. Cependant, il est généralement reconnu que le « polymer brush » correspond à des chaînes macromoléculaires en série et très proche¹⁷⁵. Dans notre cas, ce modèle ne marcherait que si Tau pouvait former une couche répulsive sur la surface du MT. Cette assertion serait possible, si dans les axones, il y avait un ratio molaire Tau:Tubuline élevé, d'autant plus qu'il a été montré que Tau diffusait le long du MT ($D = 0.15 \mu\text{m}^2/\text{s}$)^{176,177}. Dans ce modèle, les conséquences de la diffusion de Tau sur la répulsion entropique devraient donc être clarifiées : dans certains cas, Tau pourrait diffuser loin de l'interface entre deux MTs, et ne pourrait

plus exercer de forces répulsives. La pertinence de ce modèle dans les axones dépend donc du ratio molaire Tau:Tubuline dans les axones.

3. Ratio molaire Tau:Tubuline dans les axones

Malgré la quantité des publications sur l'interaction Tau:Tubuline, très peu de données permettant d'estimer le ratio molaire Tau:Tubuline dans les axones sont disponibles. Parmi elles, on retrouve :

- Un ratio molaire Tau:Tubuline d'environ 1 :12 dans la matière grise et de 1 :38 dans la matière blanche. Ces ratios ne sont pas forcément représentatifs de ceux présents dans l'axone car ils ont été obtenus à partir de MTs assemblés à partir d'extraits de cerveaux bovins¹⁷⁸.
- Un ratio molaire Tau:Tubuline compris entre 1 :34 et 1 :5 mesuré avant traitement au NGF et entre 1:68 to 1:17 pour des cellules PC12 avant traitement au NGF¹⁷⁹. Le NGF étant utilisé pour induire la formation de neurites.
- Environ 0.9 ng de Tau ont été obtenues par radioimmuno-slot-blot dans des homogénats de la matière grise de cerveaux humains post-mortem¹⁸⁰. On en déduit un ratio molaire Tau:Tubuline inférieur à 1 :30 sachant qu'il y a environ 30 ng de tubuline par µg de protéines dans des extraits de cerveaux¹⁸¹.

Ces données bien qu'utiles ne donnent pas d'estimations précises sur le ratio Tau:Tubuline dans les axones mais plus des informations sur le rapport quantitatif global dans le cerveau ou dans les neurones. Au vu de l'importance de cette information pour trancher sur le rôle de Tau dans les axones, il est très surprenant qu'elle n'ait pas été mieux étayée.

F. Modifications post-traductionnelles (MPTs) de Tau

1. Régulation de l'interaction Tau-Tubuline : la phosphorylation

Dès les années 1980, la protéine Tau a été décrite comme une phosphoprotéine^{182,183}. Bien que ces études aient été centrées sur les résidus serine et thréonine, il est maintenant connu que certaines

tyrosines peuvent également être sujettes à la phosphorylation^{184,185}. La protéine Tau 2N/4R est dotée d'environ 85 sites potentiels de phosphorylation dont 45 sont retrouvés dans la maladie d'Alzheimer (MA) (Figure I-18) (pour une table complète de la phosphorylation de Tau et des kinases correspondantes, voir <http://cnr.iop.kcl.ac.uk/hangerlab/Tautable>). Dans de nombreux cas, la phosphorylation régule la liaison de Tau aux MTs ou à ses autres partenaires. Ainsi, la phosphorylation apparaît comme la MPT la plus importante en termes de résidus touchés et de pertinence physiopathologique.

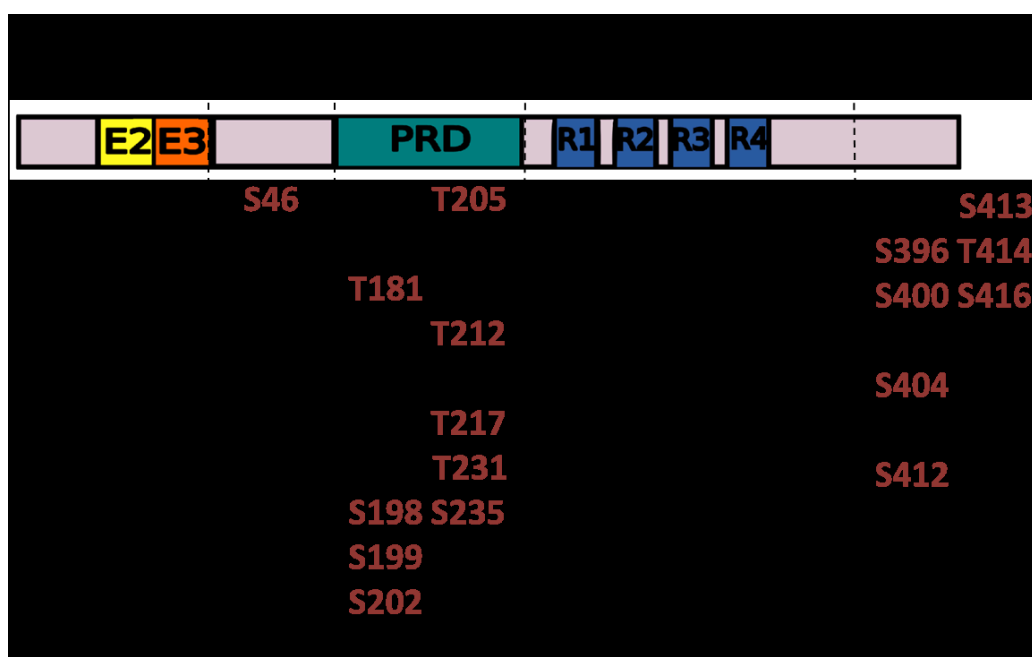


Figure I-18 : Diagramme de phosphorylations de Tau retrouvées dans les cerveaux de patients atteints de MA. Les sites indiqués en noirs sont ceux retrouvés phosphorylés chez des cerveaux atteints. Les résidus en mauves sont retrouvés à la fois dans les cerveaux malades et dans les cerveaux sains¹⁸⁶ (D'après Noble *et al.*, 2013, <http://cnr.iop.kcl.ac.uk/hangerlab/Tautable>).

A ce jour, une vingtaine de kinases capable de phosphoryler Tau ont été identifiées et composent 4 groupes distincts :

- Le premier groupe est composé des kinases dirigées sur des résidus sérine ou thréonine suivi d'une proline (PDPK) comme la kinase dépendante des cyclines 5 (cdk5)¹⁸⁷, et la 5'adenosine monophosphate-activated protein kinase (AMPK)^{188,189},
- Le deuxième groupe est composé des kinases non dirigées contre les résidus prolines (Non-PDPK) comme la casein kinase 1¹⁹⁰, la MT affinity-regulating kinase A (MARKs), l'AMP-cyclique-dépendent protein kinase A (PKA), la calcium/calmoduline dépendante kinase 2¹⁹¹ et la dual specific tyrosine regulated kinase 1A (DYRK-1A)¹⁸⁶,
- La glycogène synthase kinase-3 (GSK-3) se trouve à l'interface entre ces deux groupes, phosphorylant les résidus suivis ou non d'une proline¹⁹².
- Le dernier groupe est composé des tyrosines kinases incluant fyn¹⁸⁵, Abl et Syk¹⁹³.

En outre, plusieurs phosphatases comme les Protéines Phosphatases PP1, PP2A, PP2B, PP5¹⁹⁴ ont été impliquées dans la déphosphorylation de Tau, PP2A étant la phosphatase majeure de Tau.

2. Hyperphosphorylation de Tau et maladies neurodégénératives

Il existe une vingtaine de Tauopathies différentes^{195,196}. Leur point commun est la présence d'agrégats intracellulaires formés de protéines Tau hyper- et anormalement phosphorylées. Bien que présents dans toutes les Tauopathies, ces agrégats possèdent différentes localisations cellulaires en fonction de la maladie considérée. En effet, ils peuvent être présents dans les neurones, les astrocytes ou bien encore les oligodendrocytes. Quatre classes distinctes de Tauopathies ont été définies en fonction du type d'agrégats formés par la protéine¹⁹⁷ (Tableau I-2) :

- La classe I est caractérisée sur gel par un triplet de protéines Tau pathologiques de 60, 64 et 69 kDa.

- La classe II est caractérisée sur gel par la présence d'un doublet de protéines Tau pathologiques de 64 et 69 kDa. Cette catégorie concerne principalement les protéines Tau 4R.
- La classe III est caractérisée sur gel par la présence d'un doublet de protéines Tau pathologiques de 60 et 64 kDa. Cette catégorie concerne principalement les protéines Tau 3R.
- Le profil pathologique de la classe 4 est caractérisé sur gel par une grosse bande de Tau pathologique à 60 kDa.

Classe de Tauopathies	Tauopathies	Cellules	Références
Classe 1	Maladie d'Alzheimer	Neurones	Sergeant et al, 2005
	Syndrome de Down	Neurones	Hof et al, 1995
	Parkinsonisme Post-encéphalique	Neurones et prolongements astrocytaires	Buée-scherrer et al, 1997
	Sclérose latérale amyotrophique de l'île de Guam	Neurones	Buée-scherrer et al, 1995
	Atrophie multisystémique	Oligodendrocytes	
	Maladie de Niemann Pick de type C	Neurones	Love et al, 1995
	Démence pugilistique	Neurones	Hof et al, 1992
	Panencéphalite sclérosante subaigüe	Neurones et oligodendrocytes	
	neuroferritonopathie	Neurones	Zarranz et al, 2006

	Maladie de Gerstmann- Straussler-Sheinker	Neurones	Tranchant et al, 1997
Classe 1, 2 ou 3	FTDP-17	Neurones, oligodendrocytes, astrocytes (selon la mutation)	Hutton et al, 1998 Gasparini et al, 2007
Classe 2	Démence à grains argyrophiles	Neurones, oligodendrocytes, astrocytes	Tolnay et al, 2002
	Paralyse supranucléaire progressive	Neurones et astrocytes	Sergeant et al, 1999
	Dégénérescence cortico- basale	Neurones pyramidaux, astrocytes, oligodendrocytes	Buée-scherrer et al, 1996
Classe 3	Maladie de Pick	Neurones granulaires	Buée-scherrer et al, 1996
Classe 4	Dystrophie myotonique de type I et de type II	Neurones et astrocytes	Sergeant et al, 2001

Tableau I-2 : Répartition des principales Tauopathies en fonction des différentes classes biochimiques et des cellules possédant les agrégats de protéines Tau.

En temps normal, la phosphorylation de Tau est régulée par le développement¹⁹⁸. En effet, elle est très fréquente dans les neurones du fœtus puis, diminue avec l'âge. Par ailleurs, la phosphorylation semble influencer la distribution de Tau pendant le développement du neurone. En effet, lorsque Tau est phosphorylée dans sa région riche en proline, elle est majoritairement présente dans le compartiment somatodendritique alors que lorsque cette région est déphosphorylée, on retrouve Tau principalement dans la région distale de l'axone.

La phosphorylation semble être site-spécifique en fonction des isoformes^{192,199}. Cela pourrait être dû à la différente compartimentalisation cellulaire de chacun d'entre eux, ou au fait que les kinases et les phosphatases modulent la phosphorylation de Tau de façon différente.

Dans les situations pathologiques, on observe une forte augmentation du nombre de protéines Tau phosphorylées et/ou du nombre de résidus phosphorylés^{182,198,200-202}, certains de ces résidus pouvant être retrouvés dans des situations physiologiques^{203,204}. A cause de cette hyperphosphorylation, les protéines Tau développeraient une incapacité à se lier aux MTs. Ainsi, dans l'axone, la déstabilisation des MTs perturberait des fonctions vitales, comme le transport bidirectionnel d'organites. Alors, le neurone ne pouvant plus assurer sa survie, dégénérerait.

L'hyperphosphorylation anormale de Tau est une des caractéristiques présente dans toutes les tauopathies^{203,205}. Dans les cerveaux de patients atteints de la maladie d'Alzheimer (MA) on retrouve des accumulations de protéine Tau hyperphosphorylée dans des inclusions pathologiques^{206,207}. L'ultrastructure de ces éléments est unique : il s'agit de paires de filaments hélicoïdaux (PFH) composés de fibrilles/filaments de 10 nm de diamètre avec 80 nm de périodicité^{208,209}. Lorsque des PHF forment des fagots, ils sont appelés dégénérescences neurofibrillaires (DNF). Ces fractions insolubles dans le cerveau sont constituées d'isoformes de Tau 3R et 4R en proportions quasi-égales¹¹³.

3. Autres MPTs de Tau

Outre la phosphorylation, dans les conditions physiologiques, la protéine Tau est soumise à un ensemble complexe de modifications post-traductionnelles :

- l'acétylation dont les conséquences physiologiques et pathologiques sont encore très peu connues²¹⁰⁻²¹²,
- la transglutamination²¹³,
- la glycation : en effet, les protéines Tau isolées à partir de filaments hélicoïdaux sont glycatées ce qui pourrait être à l'origine d'agrégats plus complexes²¹⁴⁻²¹⁶,
- l'isomérisation cis-trans de la proline^{217,218}

- la nitration²¹⁹,
- la sumoylation²²⁰,
- la glycosylation, en -O ou en -N, avec la N-glycosylation intervenant sur les Tau hyperphosphorylés²²¹ alors que les Tau non modifiés sont O-glycosylés²²². La relation entre glycosylation et phosphorylation pourrait jouer un rôle sur la localisation nucléaire de Tau²²³. Il est aussi présumé que la glycosylation pourrait avoir un rôle dans la dégradation de la protéine Tau²²⁴.
- l'ubiquitination : les protéines Tau ubiquitinées ont majoritairement été trouvées dans les agrégats présents dans les neurones des patients atteints par les maladies de Pick, de Parkinson, et d'Alzheimer^{225,226}.
- l'oxydation : la présence de cystéines dans la protéine la dimérisation par la formation de ponts disulfures²²⁷. Dans ce cas, l'oxydation de Tau pourrait s'avérer être la cause d'agrégation.
- Protéolyse : Tau peut être clivée par des enzymes (ex : la calpaïne) et ainsi générer des fragments possédant une activité biologique²²⁸.

La diversité de MPTs que peut subir Tau suggère que cette protéine a de multiples fonctions et est finement régulée. Bien qu'il soit concevable que la majorité de ces MPTs puisse avoir lieu à différentes étapes des Tauopathies, leurs fonctions (particulièrement en comparaison avec le rôle déjà bien établi de la phosphorylation) restent encore à caractériser.

G. Objectifs de l'étude

Bien que la protéine Tau ait été étudiée de plus en plus intensément au cours des dernières années, il subsiste de nombreuses zones d'ombres quant à ses fonctions précises. De même, certaines de ses activités sont connues en détail au niveau moléculaire mais leur signification *in vivo* restent incertaines. Ceci est particulièrement vrai pour le rôle controversé de son domaine N-terminal dans l'organisation spatiale des MTs axonaux. En effet, actuellement, deux théories antagonistes sont proposées : la première indique que Tau induit la mise en fagots des MTs dans les axones, tandis que

la seconde considère que Tau permet leur espacement. Or, dans les axones matures, les MTs sont distribués de façon homogène et en théorie, leur organisation parallèle augmente significativement la probabilité qu'ils se regroupent. Par ailleurs, leur géométrie cylindrique et leur rigidité favorisent également leur mise en fagot par les interactions de volume exclu de courte portée (<5 nm) provoquées par l'encombrement macromoléculaire cellulaire. Cependant, d'un point de vue fonctionnel, la surface des MTs isolés est plus accessible que lorsqu'ils sont rassemblés dans les fagots et par conséquent, garder les microtubules séparés devraient alors favoriser l'accessibilité des moteurs moléculaires à la surface des microtubules et donc le transport à longue distance des cargos.

L'objectif principal de cette étude est donc de déterminer si Tau a été conçue spécifiquement pour garder les MTs axonaux bien séparés. Pour ce faire, nous avons produit trois isoformes de Tau ayant des domaines N-terminal de différentes longueurs et analysé leurs effets *in vitro* sur les mécanismes de mise en fagot des MTs en présence ou pas d'agent mimant l'encombrement macromoléculaire. En associant ces approches *in vitro* à différentes échelles à des expériences *in cellulo* et des simulations numériques, nous avons pu développer un modèle alternatif qui décrit comment la formation par Tau de ponts transversaux peut mener à une séparation efficace des MTs.

Suite à ces résultats, nous avons souhaité étudier l'effet de Tau sur les MTs lorsqu'ils sont exposés à des conditions favorisant leur déstabilisation comme un choc à froid ou l'action de protéines comme la spastine. En effet, les intermédiaires de dépolymérisation jouent un rôle important dans les phénomènes de catastrophe des MTs, notamment lorsqu'ils sont en fagots, et analyser l'effet de Tau sur ces intermédiaires permettra de mieux comprendre la fonction de Tau dans la stabilisation des MTs.

Matériels et méthodes

I. Techniques de Biologie moléculaire et de Biochimie

A. Clonage des plasmides de Tau

1. Principe du clonage Gateway®

Les plasmides de Tau utilisés au cours de ce travail ont tous été clonés grâce à la technologie Gateway®. Cette technique de clonage est basée sur les propriétés de recombinaison du bactériophage λ^{229} lors de l'intégration de son ADN dans le chromosome d'*E. coli*. Ces deux organismes ont tous les deux des sites d'attachement spécifiques conservés, *att*, qui se trouvent à la fois sur le chromosome d'*E. coli* (*attB*) et sur le bactériophage (*attP*). Le processus d'intégration (lysogénie) est catalysé par deux enzymes : l'*Int* (intégrase), encodée par le phage λ , et l'*IHF* (Integration Host Factor), encodée par *E. coli*. Une fois terminée, la recombinaison entre les sites *attB* (25 pb) et *attP* (243 pb) génère les sites *attL* (100 pb) et *attR* (168 pb) qui encadrent l'ADN intégré du phage λ . Ce processus est réversible et le passage du bactériophage en cycle lytique permet d'exciser l'insert et de reformer *attB* et *attP* respectivement sur *E. coli* et sur le phage λ . Le cycle lytique est catalysé par l'intégrase et l'excisionase (*Xis*) du bactériophage λ et l'*IHF* (Figure II-1). Les réactions *attB* x *attP* (BP) et *attL* x *attLR* (LR) utilisées dans la technologie Gateway® sont des adaptations *in vitro* des cycles lysogénique et lytique du phage λ présentés ci-dessus.

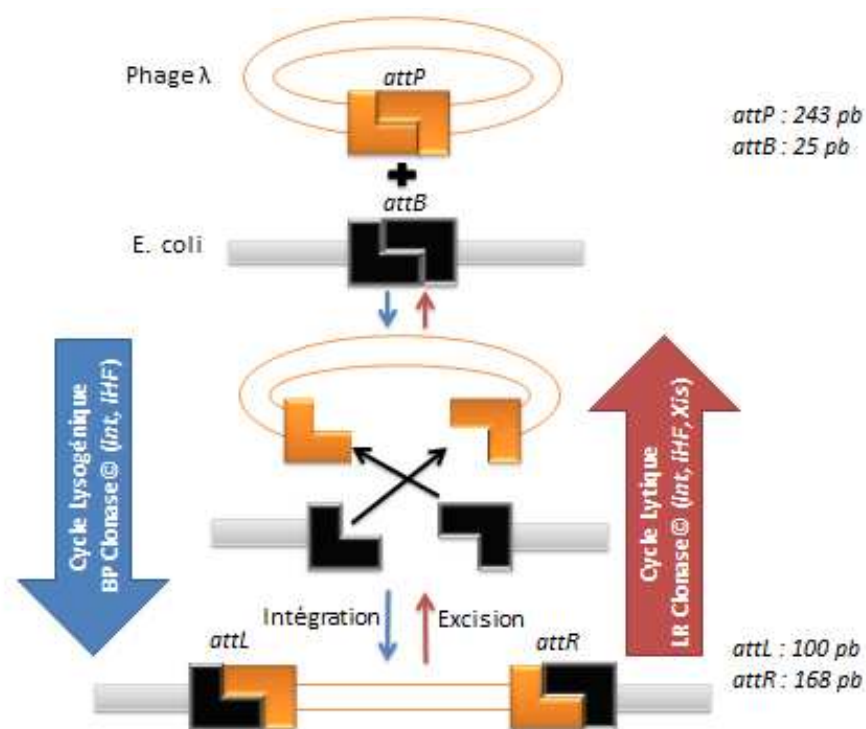


Figure II-1 : Cycle de recombinaison du phage λ dans E. coli et sites spécifiques et enzymes associées (adaptée d'Invitrogen).

2. Préparation du vecteur d'entrée pENTR™/TEV/D-TOPO

®

Afin d'insérer nos différentes constructions de Tau dans un clone d'entrée compatible avec le système Gateway®, nous avons utilisé la méthode du clonage directionnel TOPO® via le plasmide pENTR™/TEV/D-TOPO® contenant :

- Un gène de résistance à la kanamycine (Kan^R) qui permet la sélection du plasmide dans E. coli.
- Un site de reconnaissance pour la protéase TEV afin de retirer les tags en N-terminal.
- Deux sites de reconnaissance *attL* pour cloner directionnellement nos produits de PCR dans un vecteur Gateway® :
 - Le site *attL1* réagit spécifiquement avec le site *attR1* pour former *attB1*.
 - Parallèlement, *attL2* ne réagit qu'avec *attR2* pour former *attB2*.
- Des sites de clonage TOPO® pour transférer nos inserts dans le vecteur d'entrée.

Comme présenté dans la Figure II-2, le système TOPO® utilise les propriétés de la topoisomérase I du virus *Vaccinia*. Elle se lie à l'ADN double brin sur des sites spécifiques (5'-CCCTT) et le clive sur un brin en laissant un bout cohésif GTGG. Cette réaction est réversible car, en se dissociant, la topoisomérase peut rebrancher l'ADN de façon spécifique au même endroit. Grâce à cette propriété, il a été possible d'insérer nos gènes d'intérêt dans le vecteur pENTR™/TEV/D-TOPO® sans utiliser d'enzyme de restriction ni de ligase. Pour cela, lors de nos PCRs, nous avons utilisé des amorces sens débutant par 5'-CACC. En effet, ce bout cohésif complémentaire de GTGG permet de joindre directionnellement nos fragments d'ADN au vecteur d'entrée. Celui-ci ne peut être transcrit et sert uniquement de navette vers un vecteur de destination.

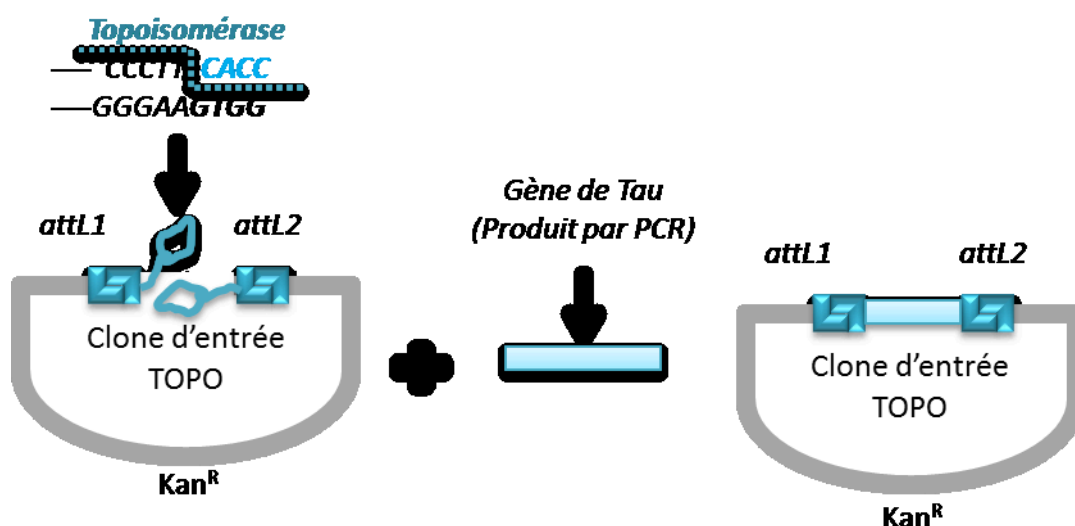


Figure II-2 : Clonage du gène d'intérêt dans le vecteur d'entrée TOPO® (adaptée d'Invitrogen).

3. Transfert dans le vecteur de destination pDEST™ 17 ®

Les clones d'entrée précédemment générés ne sont pas utiles tels quels car les sites *attL* sont trop longs (100 pb) et n'ont pas été conçus pour l'expression protéique. Ils permettent cependant de transférer très facilement le gène d'intérêt dans un vecteur de destination portant les sites *attR*. Ainsi, lorsque l'on mélange le clone d'entrée et un vecteur de destination en présence du mélange d'enzyme LR clonase®, on obtient par recombinaison un vecteur d'expression qui contient toutes les séquences nécessaires à l'expression : un gène de résistance à l'ampicilline et les sites de

recombinaisons *attB1* et *attB2* (25 pb) (Figure II-3). Les cellules qui ne reçoivent pas le gène d'intérêt héritent d'un gène *ccdB* codant une protéine toxique pour *E. coli*. La sélection du clone d'expression produit est donc double : grâce à la résistance à l'antibiotique et à la toxicité de la protéine *ccdB*. Il en résulte qu'un grand nombre de clones positifs est obtenu après transformation.

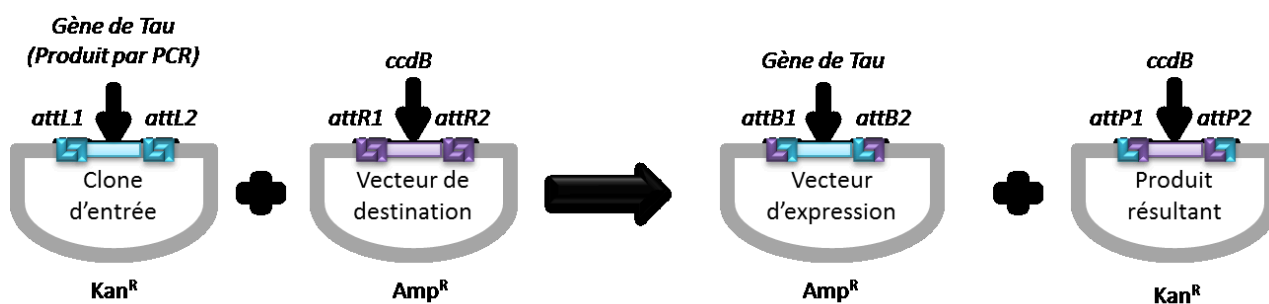


Figure II-3 : Réaction de recombinaison LR (adaptée d'Invitrogen).

4. Protocole de Clonage

- *Dessin des amorces*

Nous avons trois constructions de Tau humain avec 4 domaines de liaison aux microtubules (MTBD) :

- Tau 2N : l'isoforme naturelle pleine longueur
- Tau 0N : l'isoforme naturelle le plus court avec 4 MTBD
- Tau deltaNT : où la partie N-terminale a été tronquée, il commence à P172.

Nous sommes partis d'un plasmide commercial de Tau 2N (pET29b x hTau40) vendu par Addgene. Pour obtenir le fragment d'ADN de Tau 2N à insérer dans le plasmide pENTR™/TEV/D-TOPO®, une réaction en chaîne par polymérase (PCR) avec des amorces schématisées Figure II- 4 a suffi. Cette technique permet l'amplification de séquences d'ADN double brin *in vitro*.

Elle est basée sur la répétition de trois cycles à différentes températures :

- Un cycle de dénaturation à 98°C.
- Un cycle d'appariement des amorces qui permet leur hybridation aux ADN matrices. Il se déroule à une température qui leur est thermodynamiquement favorable (généralement $T_m + 3^\circ\text{C}$).
- Un cycle d'extension à 72°C qui permet aux polymérases de synthétiser le brin complémentaire de leur ADN matrice en utilisant des désoxynucléotides triphosphate ou dNTPs (unité élémentaire de l'ADN) présents dans le milieu réactionnel.

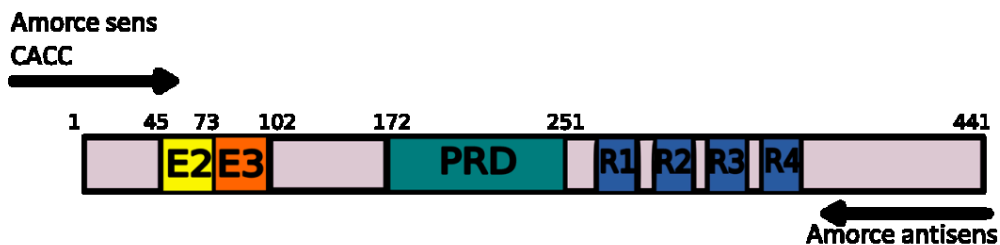


Figure II-4 : Dessin des amorces utilisées pour le clonage de Tau 2N.

Nous avons utilisé le même principe pour les amorces nécessaires au clonage de Tau deltaNT (Figure II-5).

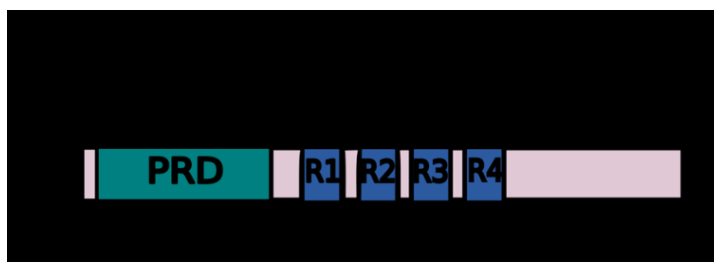


Figure II-5 : Dessin des amorces utilisées pour le clonage de DeltaNT.

Quant à Tau ON, il a fallu réaliser 3 PCRs (Figure II-6). Les deux premières PCRs ont permis d'amplifier sélectivement les fragments d'ADN situés de part et d'autre des exons 2 et 3 qui ne sont pas présents sur Tau ON. La dernière PCR a permis de joindre les 2 produits des PCR précédentes dans le but d'obtenir un clone de Tau ON.

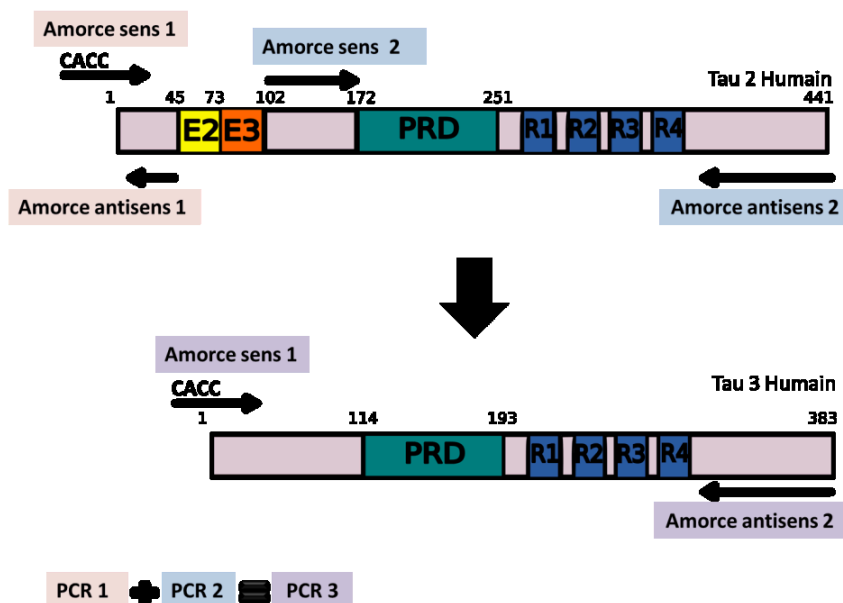


Figure II-6 : Dessin des amorces utilisées pour le clonage de Tau 3.

- *Amplification des fragments d'ADN par PCR*

Afin de réaliser nos clonages, nous avons utilisé la polymérase Phusion® High-Fidelity à 2U/μL vendue par Thermo Scientific selon les protocoles suivants (tableau II-1 et II-2) :

Composant	Quantité
H ₂ O stérile	Quantité suffisante pour (Qsp) 50 μL
Tampon Phusion 5X	10 μL
10 mM dNTPs	1 μL
Primer sens	2,5 μL
Primer antisens	2,5 μL
Matrice d'ADN	10 ng
Phusion® HF Polymerase	0,5 μL

Tableau II-1 : Protocole d'amplification des PCRs.

Etape des cycles	Température	Temps	Nombre de cycles
Dénaturation initiale	98°C	30 sec	1
Dénaturation	98°C	10 sec	35
Hybridation	T _m + 3°C	30 sec	
Extension	72°C	30 sec	
Extension finale	72°C	5 min	1

Tableau II-2 : Cycles d'amplification des PCRs.

Une fois les réactions de PCR terminées, elles sont vérifiées en déposant 50 µL de réaction et 10 µL de bleu de bromophénol 6X sur un gel d'agarose à 1,2 % masse/volume contenant 0,5 µg/ml de bromure d'éthidium (un agent intercalant de l'ADN qui fluoresce sous lumière ultraviolette et qui permet la révélation des échantillons déposés). La migration se fait dans du tampon TAE 1X (40 mM Tris-Acétate de sodium- 1mM EDTA). Enfin, nous avons utilisé le kit d'extraction de gel Thermo Scientific GeneJET pour purifier les fragments d'ADN correspondant aux clones de Tau à partir de ces gels d'agarose. Cette étape permet d'éliminer les traces résiduelles d'oligonucléotides et de matrice.

- *La réaction directionnelle TOPO*

Nous avons utilisé les amplicons purifiés précédemment afin d'établir une réaction de clonage TOPO dans un volume final de 6 µL tel que présenté dans le tableau II-3 :

Composant	Quantité
H ₂ O stérile	Qsp 6 µL
Solution saline	1 µL
Produits de PCR purifiés	0,5 – 4 µL pour obtenir un ratio molaire vecteur : insert de 1:1
pENTR™ /TEV/D-TOPO®	1 µL

Tableau II-3 : Composition du mix de la réaction TOPO.

Le mélange obtenu est incubé 15 min à température ambiante puis stocké sur glace afin de procéder à la transformation de bactéries *E. coli* compétentes.

- **Transformation des bactéries**

Le matériel génétique obtenu à la fin de l'étape précédente est transféré dans des bactéries *One Shot® TOP10 Chemically Competent E. coli* par transformation. Pour se faire, on incube sur glace 2 µL des réactions TOPO dans 50 µL de bactéries pendant 30 min. Puis, on réalise un choc thermique en plaçant chaque tube dans un bain marie à 42°C pendant 30 secondes à la suite desquelles il est remis sur glace. Ensuite, 250 µL de milieu Super Optimal broth with Catabolite repression (SOC) sont ajoutés aux bactéries et elles sont incubées 1 H à 37°C en agitant à 225 rpm avant d'être étalées sur des boîtes de Pétri standard contenant du LB agar additionné de 50 µg/mL de kanamycine. Enfin, la boîte est incubée toute la nuit à 37°C.

- **Minipréparation d'ADN et Séquençage**

Des colonies isolées issues des différentes transformations sont reprises dans 5 mL de LB supplémentés de 50 µg/mL de kanamycine. Après avoir incubé sous agitation toute la nuit à 37°C, les cultures sont centrifugées à 4000 x g pendant 10 min à 4°C. Après élimination du surnageant, l'ADN plasmidique des bactéries est purifié en utilisant le kit de minipréparation d'ADN plasmidique Thermo Scientific GeneJET. La concentration des plasmides obtenus est mesurée grâce à la spectrométrie UV à 260 nm à l'aide d'un nanophotomètre Implen. L'exactitude des séquences est vérifiée par séquençage chez Beckman Coulter Genomics avec les amorces universelles « M13 forward (-20) » et « M13 Reverse (-26) ».

- **Réaction LR**

Enfin, les inserts sont transférés du clone d'entrée au vecteur de destination grâce à une réaction LR en mélangeant les composants comme présenté dans le tableau II-4.

Composant	Quantité
Tampon TE	Qsp 4 µL
pENTR TM /TEV/D-TOPO [®] x Tau	0,5 – 3 µL pour obtenir un ratio molaire vecteur : insert 1 :1
pDEST TM -17 [®] (100 ng/µL)	1 µL
LR Clonase [®]	1 µL

Tableau II-4 : Composition du mélange de la réaction LR

Les mélanges obtenus sont incubés 1 h 30 à température ambiante puis, pour terminer la réaction, 1 μL de protéinase K est ajouté et les échantillons sont placés 15 min à 37°C. 1 μL de chaque mélange est alors utilisé pour transformer 50 μL de bactéries compétentes *Rosetta-gami*[™] 2 (DE3) *pLysS*. Le mélange est ensuite étalé sur des boîtes de Pétri contenant du LB auquel on additionne 100 $\mu\text{g}/\text{mL}$ d'ampicilline et 35 $\mu\text{g}/\text{mL}$ de chloramphénicol.

B. Production des protéines Tau humaines dans E. coli

Escherichia coli (*E. coli*) est une entérobactérie gram négative de la flore intestinale. Nous avons choisi de l'utiliser comme système d'expression car Tau est une protéine non structurée et donc facilement exprimable par un organisme procaryote. De plus, les colibacilles permettent d'obtenir rapidement de grandes quantités de protéines car ils ont une croissance rapide dans des milieux peu coûteux.

Nous utilisons la souche *Rosetta-gami*[™] 2 (DE3) *pLysS* car son chromosome porte une copie du gène de l'ARN T7 polymérase sous contrôle du promoteur *lacUV5* ce qui permet d'induire l'expression des protéines avec de l'isopropyl β -d-thiogalactopyranoside ou IPTG (analogue du lactose). De plus, elle exprime le lysozyme T7 qui empêche l'expression basale de la ARN T7 polymérase avant induction, et qui par conséquent limite les dommages causés par la protéine exprimée sur la croissance des bactéries et leur viabilité. Enfin, possédant le plasmide pRARE2, cette souche permet l'expression de protéines hétérologues en supprimant le biais des codons rares. En effet, certains codons très utilisés chez les mammifères le sont plus rarement chez *E. coli* et leur présence peut ralentir voire arrêter la traduction.

Des précultures dans 25 mL de milieu LB supplémenté de 100 $\mu\text{g}/\text{mL}$ d'ampicilline et 15 $\mu\text{g}/\text{mL}$ de chloramphénicol sont préparées et sont incubées à 37°C toute la nuit. Puis, ces précultures sont ajoutées dans 1 L de milieu LB de façon à obtenir une $\text{DO}_{600\text{nm}}$ comprise entre 0,1 et 0,2. L'aération étant critique pour la croissance des bactéries, nous préparons des erlenmeyers de 3 L contenant 25 mL d'inoculat chacun. Les cultures sont incubées sous agitation jusqu'à ce qu'elles atteignent une $\text{DO}_{600\text{nm}}$ de 0,5 puis la surexpression des protéines est induite en ajoutant 0,7 mM d'IPTG dans le milieu. 3,5 h après le début de l'induction, les bactéries sont centrifugées pendant 20 min à 4000 x g. Le surnageant (milieu) est éliminé et le culot bactérien est lavé en le resuspendant dans 30 mL de PBS.

puis centrifugé une seconde fois dans les mêmes conditions. Après élimination du PBS, le culot est conservé à -20°C jusqu'à la purification.

C. Purification des protéines recombinantes

Afin d'extraire les protéines précédemment surexprimées de leurs hôtes, nous devons dans un premier temps lyser la membrane des bactéries. Le choix du tampon de lyse est crucial car il permet à la protéine d'être très concentrée tout en restant soluble. Dans notre protocole de lyse, un culot correspondant à 1 L de bactérie est repris dans 40 mL de Tampon A (25 mM Tris-HCl, 25 mM Mes-KOH, 500 mM NaCl, 0,2 mM MgCl₂, 1 mM PMSF, 5 mM DTT, pH 7,5) auxquels sont ajoutés un cocktail d'inhibiteur de protéase *Complete Protease Inhibitor Cocktail (Roche)*. Nous plaçons les bactéries dans la glace et utilisons ensuite le sonicateur pour les lyser. La sonication se fait à une amplitude de 30 % et selon des cycles de 5 secondes d'impulsion et 10 secondes de latence pendant 5 min. Ensuite, Tau étant une protéine thermorésistante, le lysat obtenu est porté à ébullition pendant 20 min puis ultracentrifugé à 100000 x g pendant 45 min à 4°C. Ce faisant, nous éliminons les débris cellulaires, les fractions insolubles et les protéines qui n'ont pas résisté à la chaleur. Nos protéines Tau étant dotées d'une étiquette 6xHis en N-terminal, nous avons utilisé une chromatographie d'affinité sur colonne d'acide nitrilotriacétique-Ni²⁺ (HisTrap HP, 1 × 1 ml, GE Healthcare Life Sciences) pour les séparer de notre mélange grâce au protocole suivant (tableau II-5)

Etape	Volume
Equilibrage	20 Volumes de colonne (CV) tampon A
Liaison à la colonne	Volume du lysat
Lavage	20 CV tampon A
Elution	20 CV tampon B
Regénération de la colonne	25 CV H ₂ O + 25 CV EtOH

Tableau II-5 : Protocole de purification des protéines Tau sur colonne HisTrap HP®

L'éluion se fait généralement au bout de 5 CV de tampon B (25 mM Tris-HCl, 25 mM Mes-KOH, 250 mM NaCl, 250 mM Imidazole, 0,2 mM MgCl₂, 1 mM PMSF, 5 mM DTT, pH 7,5). Ensuite, afin de cliver l'étiquette 6xHis, les protéines sont dialysées contre 20 mM Tris, 20 mM Mes, 250 mM NaCl, 0,5 mM

EDTA, 1 mM DTT, pH 7,5 en utilisant la protéase TEV. Cette étape est suivie d'une seconde chromatographie d'affinité pour retirer les protéines Tau non clivées puis les fractions d'intérêt sont dialysées contre du tampon 25 mM Hepes, 250 mM NaCl, 0,25 mM DTT, 0,1 mM PMSF, pH 7,4 pour éliminer toute trace d'imidazole. Enfin, les protéines sont concentrées par ultrafiltration sur des membranes semi-perméables de polyéthersulfone Corning® Spin-X® UF 500 dont les pores retiennent uniquement les protéines de taille supérieure à 10 kDa. La concentration des protéines a été déterminée par hydrolyse acide HCl 6N.

D. Préparation de la tubuline

La tubuline a été purifiée à partir de cerveaux de brebis selon le protocole de Popov²³⁰ grâce à 2 cycles de polymérisation-dépolymérisation. Ce recyclage est effectué dans un tampon PIPES à force ionique élevée qui permet d'éliminer de façon efficace les contaminants et les MAPs tout en produisant une solution de tubuline à concentration élevée. Pour un stockage à long terme, la tubuline est aliquotée et conservée à -80°C dans un tampon 20 mM MES-KOH, pH 6,9, 0,5 mM DTT, 0,5 mM EGTA, 0,25 mM MgCl₂, 30 % glycérol, et 0,1 mM GTP. Avant usage, la tubuline est à nouveau purifiée grâce à un cycle de polymérisation suivi d'une ultracentrifugation à 52000 x g pendant 30 min et à 37°C. Une fois le culot resuspendu, la tubuline est dépolymérisée à 4°C pendant 20 min. Les agrégats de tubuline non fonctionnelle sont finalement éliminés par une autre ultracentrifugation à 4°C (52000 x g, 20 min). La concentration en tubuline est déterminée par spectrophotométrie en utilisant le coefficient d'extinction de 1,2 mg x cm² à 278 nm.

Généralement, lors de nos expériences nous utilisons un tampon de polymérisation à basse force ionique (10 mM HEPES-KOH, 4 mM MgCl₂, 20 % Glycérol, 30 mM KCl, 1 mM EGTA, 1 mM GTP, pH = 6,8). La polymérisation s'effectue à 37°C et est suivie par turbidimétrie. Enfin, au cours des différentes expériences, nous avons ajouté à la tubuline du taxol et du polyéthylène glycol 35 000 g/mol (PEG35K) à des concentrations variables indiquées dans le texte et sur les Figures :

- Le PEG est un polymère neutre qui permet de favoriser la formation de fagots de MTs en mimant efficacement l'encombrement macromoléculaire présent dans le cytoplasme, dû aux fortes concentrations de protéines (100 mg/ml soit 10 ~ 20 % v/v). Nous utilisons du PEG 35

K car notre équipe⁴⁴ a montré précédemment qu'à de plus faibles masses molaires (PEG 1K), il ne favorise pas l'attraction qui conduit les MTs à s'associer en fagots.

- Le paclitaxel (taxol) est un agent antimétabolique utilisé comme médicament dans le traitement de certains cancers. Il se lie à une poche du second domaine globulaire de la β -tubuline ce qui empêche les MTs de se dépolymériser et les stabilise. Le taxol est aussi connu pour diminuer la concentration critique (concentration seuil en-dessous de laquelle il n'y a pas de polymérisation nette).

II. Microscopie à force atomique

A. Description du principe de la microscopie à force atomique

Le microscope à force atomique (AFM) a été inventé en 1986 par Gerd Binnig, Christoph Gerber et Calvin F. Quate. Les images par AFM sont obtenues par le balayage sur une surface d'une pointe de dimension nanométrique disposée sur un microlevier flexible en silicone. Ces déplacements sont obtenus et commandés par les déformations d'une céramique piézo-électrique sous l'effet des tensions qui lui sont appliquées. Ainsi, lorsque l'échantillon est approché de la pointe, les forces d'interaction entre la pointe et l'échantillon provoquent une déflexion du microlevier proportionnelle à l'intensité de la force. Cette déflexion est mesurée grâce à un faisceau laser réfléchi dirigé sur une photodiode à 4 quadrants située sur la face arrière du microlevier qui convertit les déplacements du spot lumineux en signaux électriques dans les trois directions (x, y, z). Ces signaux électriques sont traités par une électronique de contrôle et la répétition de ce processus ligne par ligne permet d'aboutir à la construction d'une image tridimensionnelle de la surface de l'échantillon (Figure II-7). Cette technique nous permet de mieux comprendre au niveau moléculaire, l'organisation des MTs dans différents contextes physiologiques. Nous pouvons ainsi suivre expérimentalement la mise en fagot des MTs et le rôle de Tau dans ce processus, mais aussi la structure des intermédiaires de dépolymérisation grâce à une résolution nanométrique.

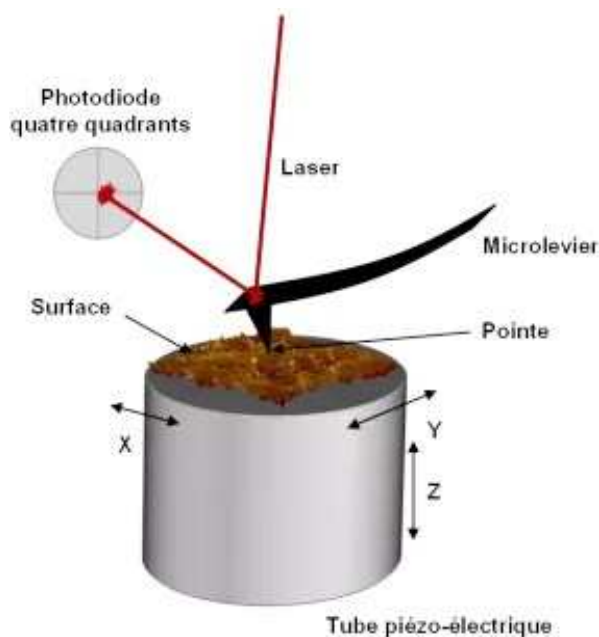


Figure II-7 : Schéma de principe d'un AFM (Image de Biophy Research).

B. Mode peak force

Nos expériences ont été réalisées avec le mode peak force tapping du Nanoscope V (Bruker/Veeco, Santa Barbara, CA). Le principe de ce mode repose sur la mesure des différentes forces d'interaction (forces de répulsion ionique, forces de Van-der-Waals, forces électrostatiques, etc...) correspondant à l'adhésion de la pointe sur l'échantillon comme présenté Figure II-8 :

- Lorsque celle-ci est loin de la surface, elle ne subit presque aucune force (Point A).
- Plus la pointe approche l'échantillon, plus le levier est attiré par sa surface par des forces d'attraction (forces de Van-der-Waals, forces électrostatiques, forces capillaires). Puis les forces attractives deviennent supérieures à la raideur de l'échantillon et la pointe adhère à la surface (point B).
- La pointe reste ensuite sur la surface jusqu'à atteindre la position en Z où le maximum des forces d'adhésion (peak force) est atteint (point C).

- Après le contact, ce sont les forces répulsives à courtes portées qui dominent l'interaction entraînant un retrait de la pointe. La force d'adhésion diminue jusqu'à ce qu'elle atteigne à nouveau son minimum au point D.
- Une fois que la pointe ne touche plus la surface, la force est de nouveau très petite voire nulle (point E).

Les informations de la position en Z sont traduites par un algorithme pour chaque pixel et permettent de construire une image tridimensionnelle et d'obtenir les propriétés mécaniques de l'échantillon.

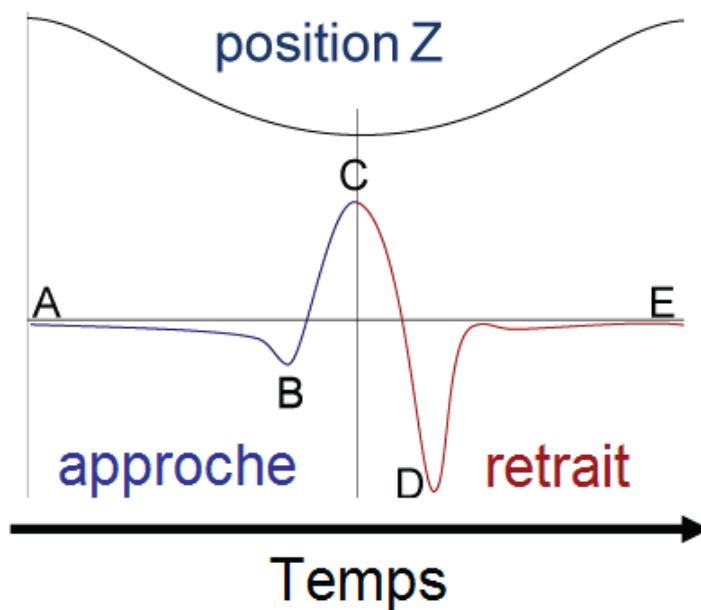


Figure II-8 : Force d'adhésion en fonction du temps pendant un cycle de Peak Force Tapping (Image adaptée de Brucker).

C. Adsorption sur le mica

Pour obtenir une résolution à l'échelle nanométrique, l'imagerie AFM nécessite l'adsorption et l'immobilisation des MTs sur une surface atomiquement plane et biocompatible. Notre choix s'est porté sur le substrat le plus communément utilisé, le mica muscovite, dont la rugosité s'établit

autour de $0,058 \text{ nm}^{231}$. Le mica est également une surface très négativement chargée permettant d'envisager une adsorption électrostatique des biomolécules.

L'adsorption de biomolécules négativement chargées tels que les MTs est rendue possible grâce à l'ajout de cations multivalents. Ces ions forment des ponts salins entre la surface du mica et la biomolécule grâce à des forces électrostatiques faibles²³². Dans notre cas, l'adsorption est due à la présence de cations divalents (Mg^{2+}) dans le tampon de polymérisation. Traditionnellement, nous déposons $10 \mu\text{L}$ de l'échantillon sur du mica et les laissons incuber 20 s pour permettre la diffusion et l'adsorption des MTs. L'immobilisation définitive des biomolécules est réalisée en plongeant l'échantillon 30 s dans une solution d'acétate d'uranyle $0,02 \%$ (masse/volume). Enfin, la surface est très rapidement rincée avec de l'eau milliQ et séchée avec du papier filtre²³³.

Pour obtenir une image à haute résolution en AFM, la surface doit être très peu chargée en biomolécules. Or, diluer les MTs au-delà de la concentration critique conduit à leur dépolymérisation. Pour contourner ce problème, une possibilité est de diminuer le temps de contact entre l'échantillon et le mica pour limiter la quantité de MTs adsorbés sur la surface. Cependant, les MTs sont de grandes structures qui diffusent lentement dans le tampon de polymérisation visqueux à cause du glycérol (20% dans nos conditions). Par conséquent, la tubuline libre et les petits microtubules seront plus rapidement adsorbés au détriment des longs microtubules, ce qui peut générer une image qui sera non représentative de l'échantillon. Il faut alors déposer l'échantillon pendant un temps suffisamment long pour permettre l'adsorption de la plupart des microtubules (entre 20 s et 1 min) mais la densité de MTs déposés sur la surface est élevée dans de telles conditions. L'autre possibilité est de diluer l'échantillon après l'assemblage des MTs, mais cela nécessite une stabilisation avec du taxol.

D. Description de la préparation des échantillons d'AFM

Pour éviter la présence d'agrégats qui pourraient limiter la résolution de l'image AFM, il est nécessaire de recycler 3 fois la tubuline avant de l'utiliser dans du tampon $10 \text{ mM HEPES-KOH pH } 6,8$, 30 mM KCl , 20% glycérol, 1 mM EGTA , 4 mM MgCl_2 , 1 mM GTP . La tubuline est ensuite polymérisée et déposée sur le mica. En fonction des conditions indiquées sur les Figures, la tubuline peut être incubée 20 min en présence de Tau, de $10 \mu\text{M}$ de taxol et de 1% PEG35K. Toutes les étapes de préparation des échantillons doivent s'effectuer à 37°C .

III. Microscopie électronique à transmission

A. Principe de la microscopie électronique en transmission

Nous avons utilisé la microscopie électronique pour mettre en évidence des différences potentielles dans la séparation des MTs en présence de Tau avec et sans encombrement macromoléculaire. Nos échantillons ont été imagés sur un microscope électronique en transmission (ou MET) Zeiss CEM 902. Ce matériel nous a permis d'effectuer une analyse structurale voire ultrastructurale des microtubules. Cette technique repose sur l'interaction des électrons avec la matière et la détection des électrons ayant traversé l'échantillon. Dans le microscope utilisé, la résolution de l'image est basée sur :

- La nature ondulatoire des électrons qui sont extraits d'un filament métallique en forme de V porté à haute température (cathode chaude). Cette opération s'effectue dans un canon à électrons situé au sommet de la colonne. Les électrons sont ensuite accélérés par une forte tension générée par l'anode afin d'augmenter considérablement leur vitesse,
- L'existence de lentilles magnétiques associées à des diaphragmes (système condenseur) capable de focaliser un faisceau parallèle d'électrons monocinétiques. Elles permettent de modifier le mode d'éclairage de l'échantillon (faisceau parallèle ou convergent). Les électrons sont alors dirigés vers l'échantillon.
- Une lentille objective est placée à la sortie de l'échantillon, permet de sélectionner soit le faisceau directement transmis (sans interaction avec l'échantillon) appelé champ clair, soit les électrons élastiquement diffusés (ou diffractés si l'échantillon est cristallin) appelé champ sombre.
- L'existence d'un système de vide performant permettant aux électrons de se déplacer librement à l'intérieur de la colonne,
- La présence du système d'acquisition des images électroniques grâce à une caméra Megaview III CCD et traitée grâce au logiciel ITEM (Olympus Soft Imaging Solution) avec un grossissement de 79 000x.

L'acquisition des images et la préparation des culots ont été réalisées par nos collaborateurs (Olivier Piètrement et Catherine Durieu) à l'Institut Gustave Roussy.

B. Description de la préparation de l'échantillon

Nous avons appliqué le protocole ci-dessous pour enrober de résine des culots de MTs afin de préparer des coupes ultrafines transparentes aux électrons :

- On polymérise 20 μ M de tubuline aux concentrations de PEG et de Tau indiquées dans le texte ou dans les Figures. Le tampon de polymérisation utilisé est 10 mM HEPES–KOH, 30 mM KCl, pH 6,8, 1 mM EGTA, 4 mM MgCl₂ et 1 mM GTP, 20 % glycérol.
- Après lavages, on centrifuge à 20 000 \times g les MTs pendant 30 min à 37 °C puis, après élimination du surnageant, les culots sont recouverts avec le tampon de fixation (tampon de polymérisation complété de 1 % glutaraldéhyde et de 0,2 % acide tannique).
- On post-fixe les échantillons avec 1 % de tétroxyde d'osmium dans du tampon cacodylate à 0,1 M, pH 7,3.
- Après lavages, on déshydrate les culots dans l'éthanol afin de remplacer l'eau par l'éthanol. Pour ce faire, nous effectuons plusieurs bains de 10 min dans de l'éthanol en concentration croissante (50 %, 70 %, 80 %, 90 % jusqu'à 100 %). De façon similaire, l'éthanol est progressivement remplacé par le milieu d'enrobage (résine Epoxy, Embed-812). Pour cela, les culots sont laissés pendant 1 à 2 h dans des bains successifs de résine/éthanol en concentration croissante de résine (1/3, 1/2, 2/3). L'imprégnation se termine par un dernier bain de 16 h dans la résine pure. La polymérisation de la résine s'effectue à 60 °C pendant 48 h. Les culots sont enrobés dans des bains de concentration croissante de résine Epoxy (Embed-812 Embedding kit #14120, EMS).
- Les échantillons durcis sont coupés en coupes ultrafines de 40 nm d'épaisseur à l'aide d'un ultramicrotome (UCT Leica). Les coupes sont déposées sur des grilles de cuivre recouvertes de collodion et de carbone. Enfin, afin d'augmenter le contraste de l'échantillon, les coupes sont colorées avec 2 % (poids/volume) d'acétate d'uranyle aqueux pendant 20 min et de solution de Reynold (citrate de plomb) pendant 5 minutes.

IV. Turbidimétrie

Nous avons utilisé la turbidimétrie afin d'étudier les effets de partenaires ou des conditions expérimentales (PEG 35K, force ionique) dans les différences sur l'assemblage des MTs. Cette technique est basée sur les variations de la diffusion de la lumière du faisceau incident dans une solution contenant des particules dispersées. Lorsqu'un faisceau de lumière traverse un milieu dans lequel les particules sont petites, le rayon incident est peu dévié. Au contraire, lorsque les particules sont grosses, la lumière va diffuser dans toutes les directions de l'espace et ainsi diminuer l'intensité du faisceau recueillie.

In vitro, en présence de GTP, il est possible de suivre les trois phases de polymérisation de la tubuline et une phase éventuelle de désassemblage, en présence d'agents déstabilisants (froid, drogues, dilution...) (Figure II-9).

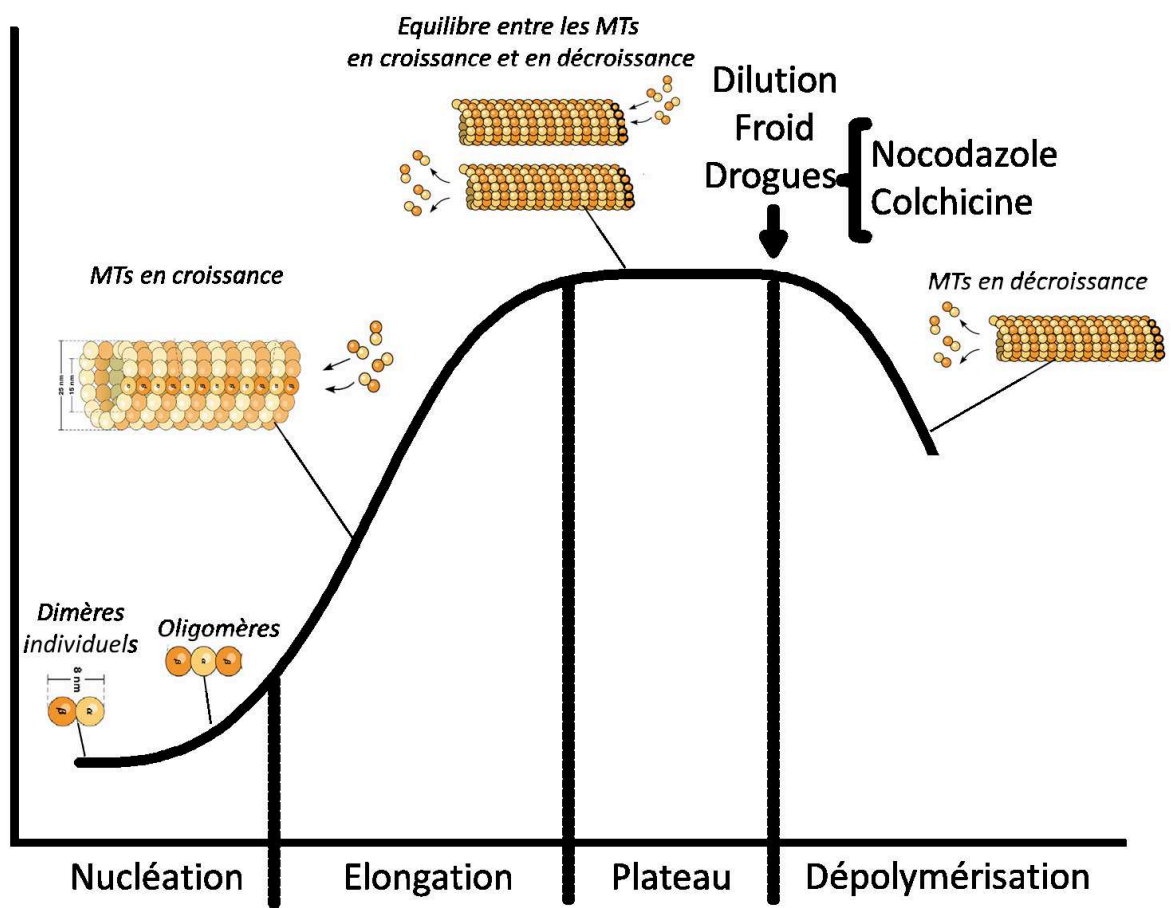


Figure II-9 : Cinétique d'assemblage de MTs suivi par turbidimétrie.

Nous avons suivi la polymérisation de la tubuline par turbidimétrie à 370 nm grâce à un spectrophotomètre Ultrospec 3000 (GE Healthcare, Fairfield, CT) équipé d'un contrôleur de température. Sauf indications contraires, les expériences ont été menées en utilisant 15 à 40 μM de

tubuline dans un tampon de polymérisation à faible force ionique (10 mM HEPES–KOH, 30 mM KCl, pH 6,8, 1 mM EGTA, 4 mM MgCl₂ et 1 mM GTP, 20 % glycérol) à 37°C.

V. Technique de biologie cellulaire

A. Culture de cellules HeLa

Les cellules HeLa sont des lignées épithéliales provenant de carcinomes humains. Nous avons choisi ces cellules comme modèle d'étude car elles permettent de déterminer l'effet des protéines Tau sur la mise en fagot des microtubules de façon reproductible, rapide et à faible coût. Les HeLa sont entretenues dans du milieu Dulbecco's modified Eagle's (DMEM) supplémenté avec 5 % de sérum de veau fœtal (SVF, Invitrogen) et additionné de Pénicilline (100 unités/ml) (Invitrogen) et de Streptomycine (50 µg/ml) (Invitrogen). Pour toutes les expériences, les cellules HeLa sont cultivées sur des lamelles de verres (18 mm x 18 mm) préalablement traitées avec de la poly-L-lysine, placées au fond des puits de culture. Afin d'exprimer nos différentes constructions de Tau dans les cellules HeLa, nos clones ont été transférés dans des plasmides Gateway pEF-DEST51 par réactions LR. Nous avons ensuite utilisé de la lipofectamine 2000 (Invitrogen) diluée au 1/100 (sans sérum et sans antibiotique) dans du DMEM mixé avec les plasmides pEF-DEST51 x Tau pour les faire pénétrer dans la cellule. Cet agent de transfection utilise ses particules lipidiques cationiques pour entrer en contact avec le plasmide et l'incorporer. Une fois le complexe plasmide-lipofectamine, les particules sont mises en contact avec les cellules et fusionnent avec leurs membranes ce qui permet l'entrée des plasmides dans les cellules-cibles. Nous retirons le milieu dans lequel sont ensemencées les cellules et nous le remplaçons par le DMEM (sans sérum et sans antibiotique) contenant les complexes. 5 h après la transfection, le DMEM est remplacé par un milieu complet. Pour une meilleure efficacité, les cellules sont de 30 à 50 % de confluence au moment de la transfection. Enfin, la fixation des cellules se fait dans un premier temps par déshydrogénation grâce à du méthanol froid immédiatement suivie par une étape de pontage dans une solution de PBS-sucrose 150 mM contenant 4 % de paraformaldéhyde pendant 25 min à 37 °C.

B. Immunofluorescence

Après fixation, les cellules sont rincées trois fois dans du PBS pendant 30 minutes. Les échantillons sont ensuite perméabilisés et saturés dans du tampon de saturation (NaCl 0,15 M, Tris-HCl pH 7,4 0,02 M, Triton 0,1 %, BSA 2 %) pendant 45 minutes puis incubés avec les anticorps primaires anti-Tau (SC-1995, Santa-Cruz, CA) et anti- α -tubuline E7 dilués dans le tampon de saturation au 1:2000 pendant 2 h. Les cellules sont ensuite rincées au PBS puis incubées 1 h avec les anticorps secondaires (dilution 1:2500) couplés à des fluorochromes (Alexa Fluor 488 et 555 Invitrogen) dans du tampon de blocage. Après 3 rinçages au PBS, les lamelles contenant les cellules sont montées sur des lames de verre à l'aide du milieu de montage.

VI. Mesure des ratios de fluorescence

A. Principe de la technique

La mesure des ratios de fluorescence sur des cellules est une technique simple qui nous permet d'approximer *in situ* la quantité relative de Tau par rapport aux MTs. Cette méthode s'appuie sur le principe de l'immunofluorescence indirecte (Figure II-10). On utilise deux types d'anticorps :

- Des anticorps primaires non conjugués pour marquer spécifiquement les MTs et Tau dans la cellule
- Des anticorps secondaires fluorophore-conjugués dirigés contre l'anticorps primaire. Le fluorophore permet de visualiser la distribution de la cible dans l'échantillon sous un microscope à fluorescence.

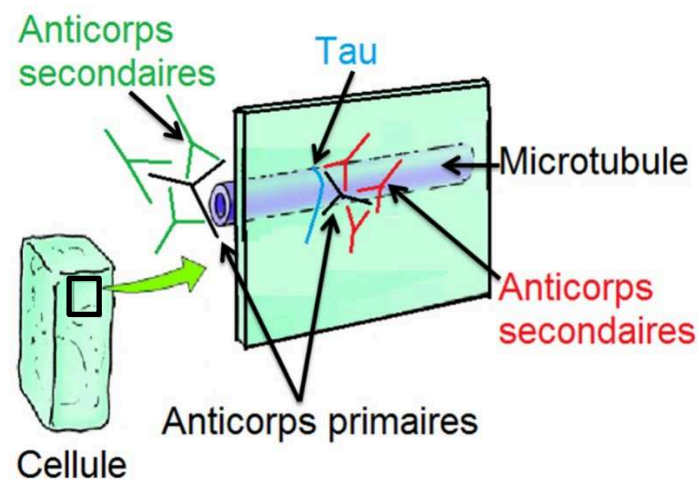


Figure II-10 : Immunomarquage de Tau et des MTs dans les cellules

Les fluorophores des anticorps secondaires sont choisis de telle façon qu'ils émettent chacun des spectres d'excitation-émission différents et bien séparés. Dès lors, on peut étendre le ratio entre les intensités des différents fluorochromes aux nombres d'anticorps secondaires qui se sont hybridés *in situ*. Par conséquent, la microscopie à fluorescence peut devenir quantitative et permettre de caractériser la distribution cellulaire des MTs et de Tau. Les avantages de cette technique se résument à sa facilité et à sa rapidité : elle ne nécessite pas les procédures d'extraction ou de concentration requises pour l'utilisation d'un spectrophotomètre ou de blotting. Cependant il est particulièrement important de minimiser la variabilité de la fluorescence mesurée pour chacun des spectres lors de l'acquisition. Les cellules doivent être photographiées avec les mêmes paramètres d'acquisition et dans un intervalle de temps le plus court possible à une exposition assez faible pour éviter les phénomènes de photoblanchiment.

B. Préparation des échantillons

Nous avons étendu l'application de la technique précédente à nos études *in vitro*. Les expériences sont basées sur le même principe que *in cellulo* à la différence que les images sont acquises sur des MTs préalablement polymérisés *in vitro* et déposés sur du mica.

Pour ce faire, la tubuline est polymérisée dans les mêmes conditions que pour les échantillons de turbidimétrie. Au plateau, les MTs sont déposés sur du mica puis plongés quelques secondes dans un bain d'acétate d'uranile à 0,02 % (masse/volume) suivi d'un bain de 10 min de 4 % (volume/volume)

de paraformaldéhyde dilué dans du PBS chaud pour fixation. Les échantillons sont ensuite lavés 5 fois 10 min dans un bain de PBS puis incubés 0,5 h dans le tampon de blocage. Cette étape permet de minimiser les liaisons non-spécifiques entre les anticorps et la surface du mica. Après le blocage, une solution diluée d'anticorps primaire est incubée avec les micas sous agitation modérée à 4°C toute la nuit. Puis, les échantillons sont rincés trois fois avec du PBS afin d'enlever les anticorps primaires non liés, puis sont exposés aux anticorps secondaires. Enfin, après avoir été de nouveau lavés 3 fois avec du PBS, les échantillons sont incubés 2,5 h avec les anticorps secondaires puis montés sur des lames de 76 x 26 mm. Les anticorps utilisés sont identiques au point VI-B et ont été dilués de la même façon.

In cellulo, les échantillons sont préparés comme décrit au point VI-B.

C. Analyse des données

Pour analyser les échantillons *in vitro*, nous utilisons le logiciel imageJ et le script « Find Peaks » développé par BAR qui permet de trouver les maxima et les minima à partir d'un graphique (Figure II-11) :

- La première étape est d'ouvrir l'image avec imageJ et de repérer une région où les MTs sont isolés. Puis, il faut tracer un trait passant par 5 MTs isolés et créer un graphique représentant les valeurs liées à l'intensité des MTs le long d'un trait en allant dans `analyze>Plot profile`.
- Ensuite, nous déterminons l'intensité de la fluorescence d'un MT isolé (I_{MTi}) en soustrayant l'intensité minimale (I_{min}) à l'intensité maximale (I_{max}) (figure II-11).

Ce qui nous permet de calculer l'intensité moyenne d'un MT isolé ($\overline{I_{MTi}}$) grâce à la

$$\text{formule : } \sum \left(\frac{I_{max} - I_{min}}{n} \right) \text{ avec } n = \text{nombre de MTs.}$$

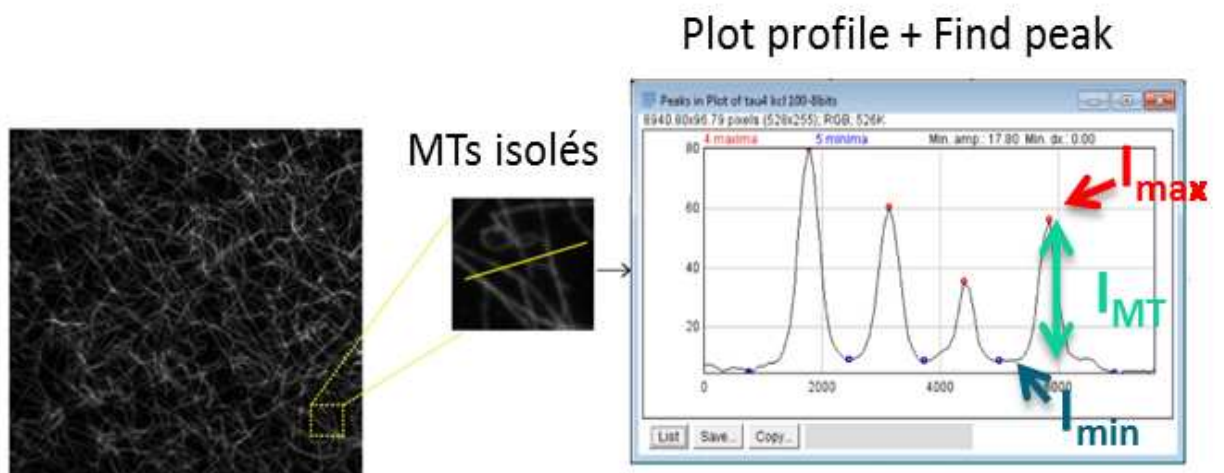


Figure II-11 : Calcul de l'intensité moyenne de la fluorescence de MTs isolés (I_{MT}) déposés sur du mica par imagerie optique

- Enfin, nous normalisons l'intensité de 60 MTs recueillie comme précédemment par rapport à

la valeur $\overline{I_{MTi}}$ grâce à la formule : $I_{MT} = \sum \left(\frac{I_{max} - I_{min}}{\overline{I_{MTi}}} \right)$. Lorsque la valeur obtenue est

proche de 1, nous considérons que le MT est isolé. La fluorescence moyenne des fagots de MTs est supérieure à celle des MTs isolés ce qui nous a permis de comparer la mise en fagots en présence de PEG 35K avec ou sans Tau (Figure II-12). Nous avons pu différencier les deux populations grâce à deux tests statistiques :

- Kruskal-Wallis : test non paramétrique permettant de déterminer si les échantillons proviennent d'une même population (ou de populations ayant des caractéristiques identiques) ou si au moins un échantillon provient d'une population différente des autres.
- Student bilatéral : test paramétrique permettant de comparer les moyennes de deux échantillons indépendants.

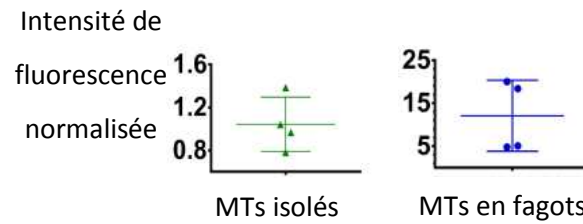


Figure II-12 : Exemple d' I_{MT} représentés sous forme de nuages de points (à gauche) pour des MTs isolés (à droite) pour des MTs en fagots lors d'une expérience *in vitro*.

Pour l'analyse des données cellulaires, on utilise le même principe afin de distinguer les MTs isolés des MTs en fagots. A partir d'un profil de fluorescence, la hauteur des pics représentant des structures microtubulaires sont mesurées et comparées à la valeur moyenne de pics de MTs isolés.

Lorsque I_{MT} dépasse de 60% $\overline{I_{MTi}}$ nous avons considéré que des fagots de MTs se sont formés dans la cellule (Figure II-13).

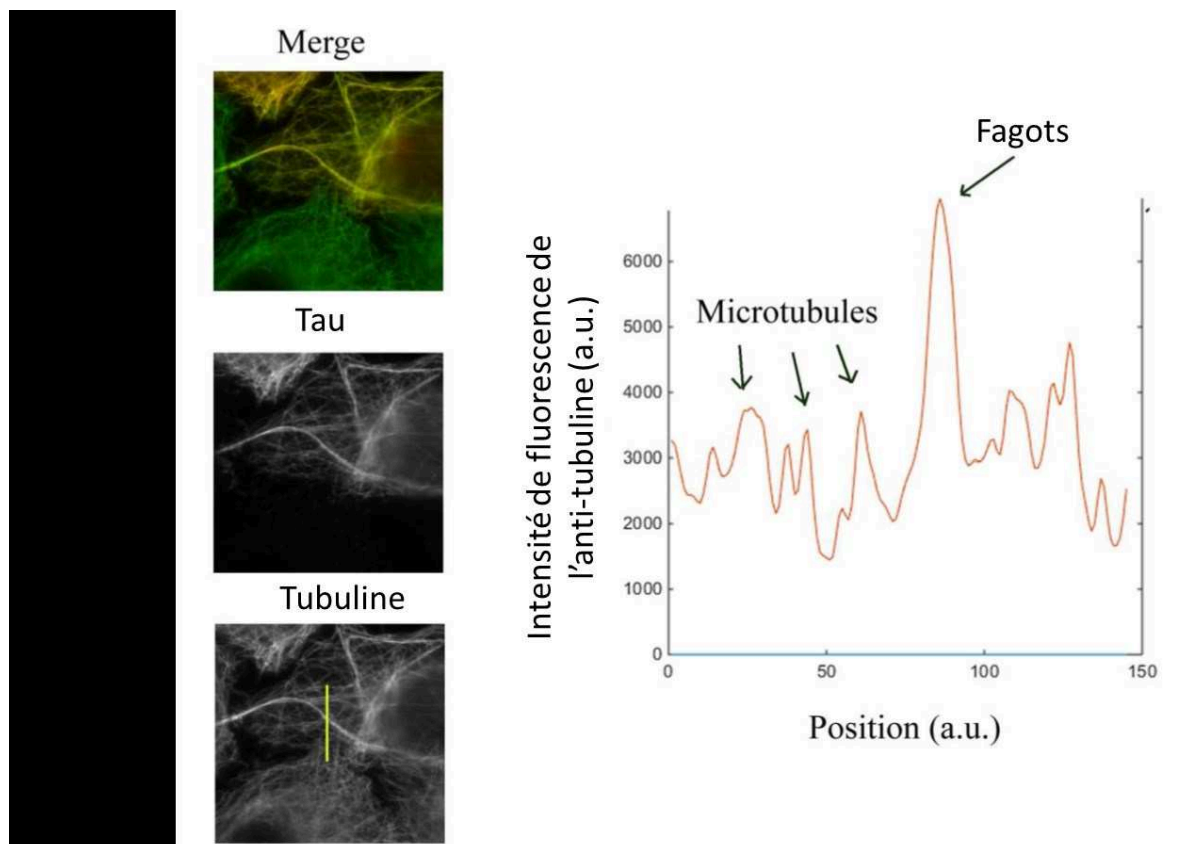


Figure II-13 : Exemple de profil de l'intensité de la fluorescence de l'anti-tubuline le long d'une ligne dans une cellule HeLa.

Enfin, pour le calcul des ratios de fluorescence Tau : Tubuline ($\frac{I_{\text{Tau}}}{I_{\text{MT}}}$), nous avons également tracé une ligne traversant des structures microtubulaires sur des cellules immunomarquées avec des anticorps marqués anti-tau et anti-tubuline comme indiqué VI-B. Nous déterminons les intensités de Tau (I_{Tau}) et des MTs comme expliqué précédemment afin de calculer $\frac{I_{\text{Tau}}}{I_{\text{MT}}}$ (Figure II-14). Pour chacune des cellules, les valeurs reportées sur les figures sont des moyennes de trois ratios $\frac{I_{\text{Tau}}}{I_{\text{MT}}}$.

Il est également important de noter que le bruit de fond a été soustrait de toutes les valeurs d' I_{MT} et d' I_{Tau} .

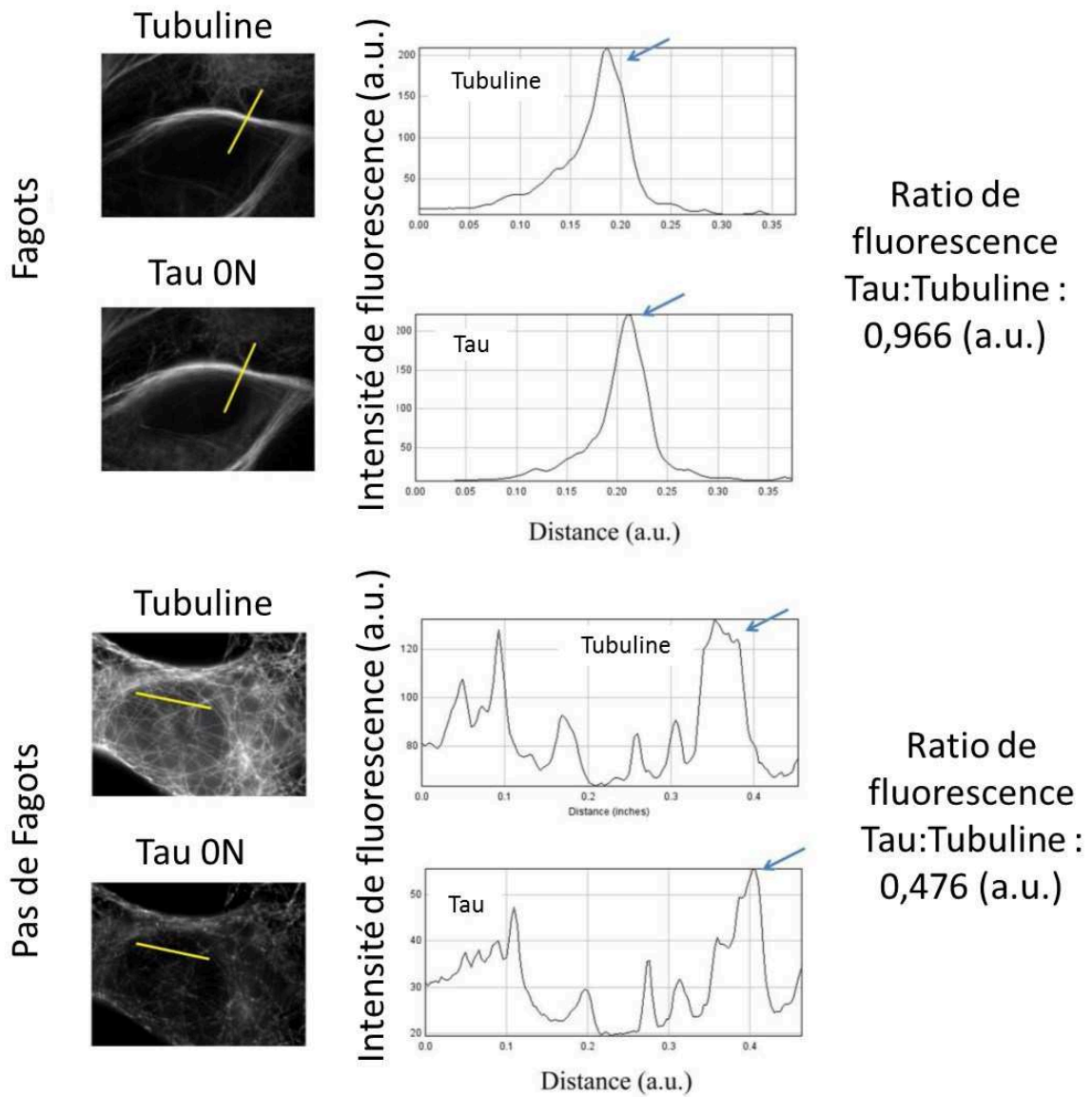


Figure II-14 : Détection de la mise en fagot dans un contexte cellulaire par imagerie optique

III. Résultats

Partie 1 : Rôle de Tau dans la mise en fagot des MTs

A. Introduction

Dans cette première partie, nous avons voulu répondre aux questions suivantes :

- Est-ce que la protéine Tau est capable d'induire des fagots de MTs *in vitro* ?
- Quelles sont les conditions expérimentales qui permettent de les observer ?
- Quelle est l'influence de la partie N-terminale dans ce processus ?
- Est-ce que les résultats obtenus *in vitro* peuvent être corrélés avec ce qui se passe dans la cellule ?

Afin de répondre à ces différentes questions, nous avons dans un premier temps exprimé et purifié trois isoformes de Tau (Figure III-1). Ces variants ont des différences au niveau de la longueur du domaine de projection (N-terminal), ce qui nous a permis de déchiffrer *in vitro* l'effet de la partie N-terminale sur l'organisation des MTs par turbidimétrie, microscopie à fluorescence et AFM. Nous avons aussi analysé l'influence des paramètres expérimentaux et, en particulier, la force ionique sur l'interaction de Tau sur les MTs. Enfin, nous avons surexprimé les mêmes constructions dans des cellules HeLa et comparé l'organisation du cytosquelette microtubulaire avec nos résultats *in vitro*.

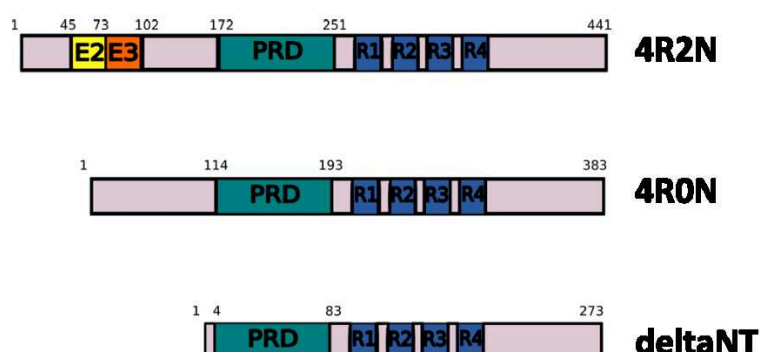


Figure III-1 : Organisation des trois isoformes utilisés.

B. Expression et purification des protéines recombinantes

Après avoir testé différentes souches de bactéries *E. coli*, nous avons finalement choisi d'exprimer nos plasmides de Tau dans des Rosetta-gami 2 (DE3) pLysS[®] pour les raisons expliquées dans le chapitre précédent. Comme on peut le constater Figure III-2, le niveau d'expression de la protéine est similaire cependant, nous avons observé que les Rosetta-gami 2 (DE3) pLysS avaient une courbe de croissance supérieure aux BL21-Gold(DE3)[®]. Par conséquent, nous avons choisi d'utiliser cette souche car le rendement masse de protéine final/volume de bactéries cultivées était supérieur.

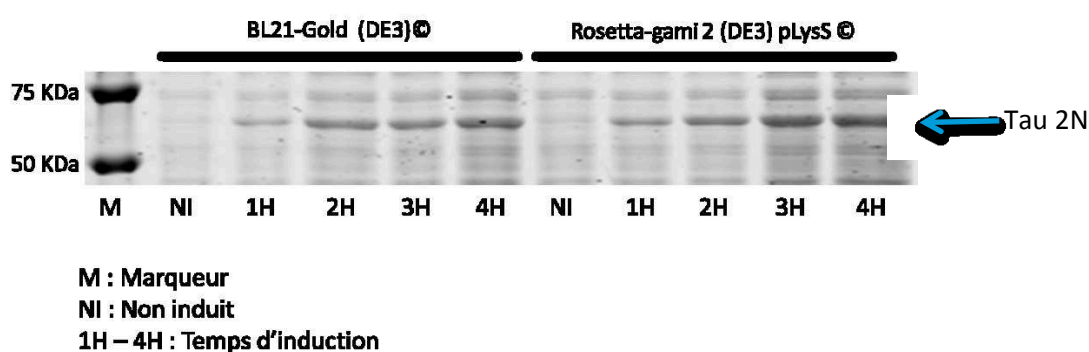


Figure III-2 : Exemple de test d'expression avec la protéine Tau 2N sur deux souches différentes d'*E. coli* à $DO_{600nm}=0,5$.

Après induction, le culot bactérien est resuspendu, lysé, puis filtré avant d'être passé sur une colonne de chromatographie. Nous avons testé plusieurs types de chromatographies (gel-filtration, échange d'ions, combinaison des deux), avant d'opter pour la chromatographie d'affinité sur colonne nickel. Une queue 6xhis a été ajoutée à l'extrémité N-terminale de nos protéines ce qui nous a permis d'obtenir en une seule étape des fractions suffisamment pures pour réaliser des expériences *in vitro*. A chaque étape de la purification (Lyse des bactéries, passage sur la colonne, lavage, élution), des échantillons ont été prélevés puis déposés sur un gel dénaturant SDS 12,5 % afin de contrôler la pureté des protéines obtenues (Figure III-3 à 5).

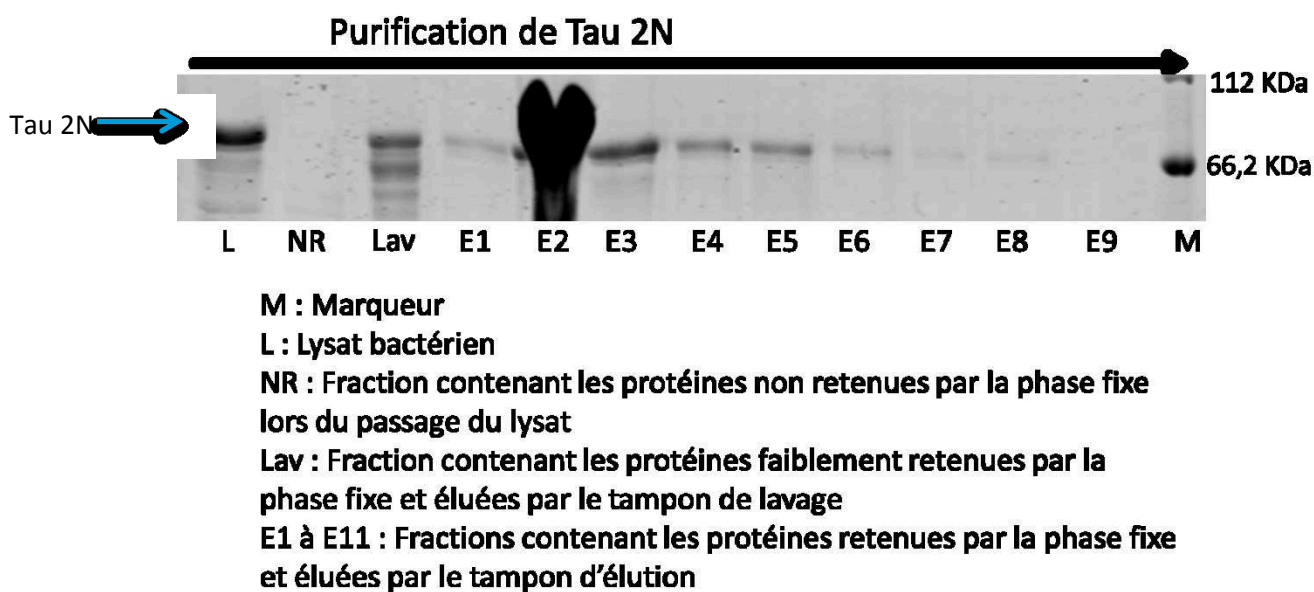


Figure III-3 : Gel dénaturant associé à la purification de la protéine Tau 2N recombinante après purification sur colonne Ni-sepharose.

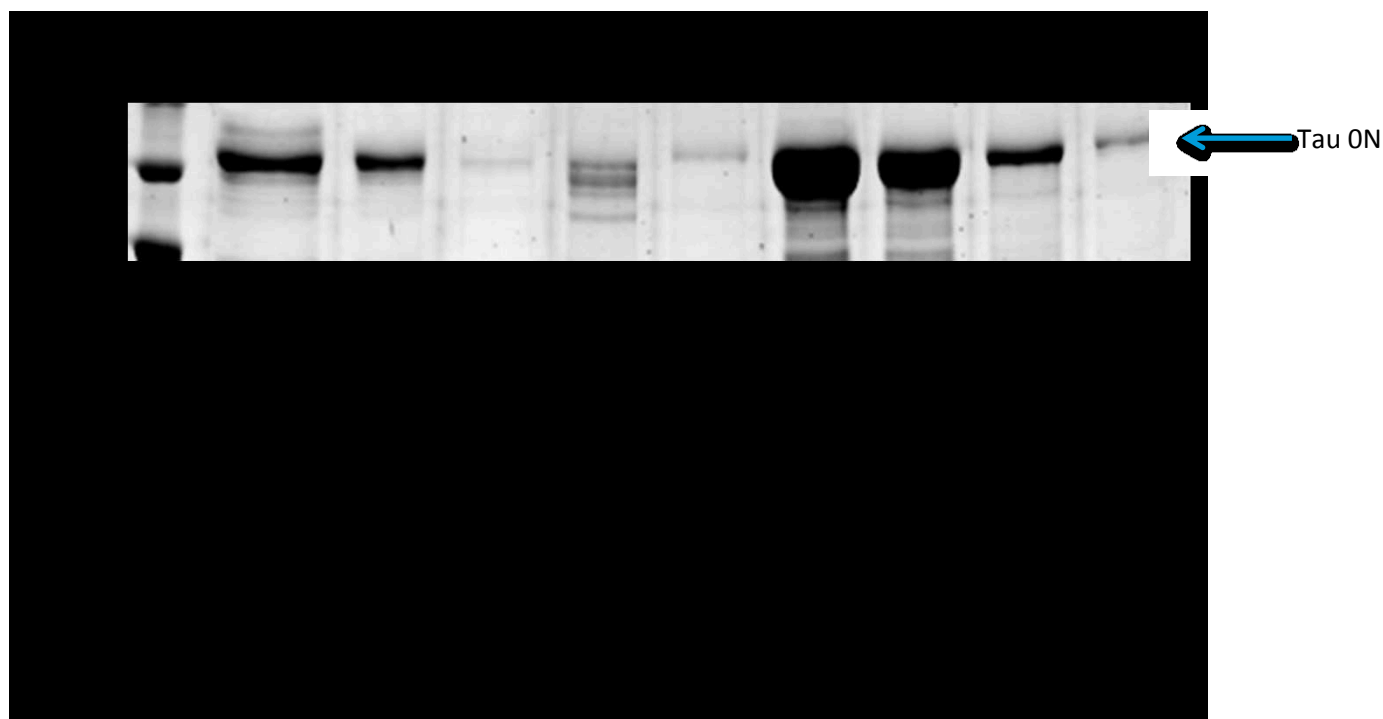
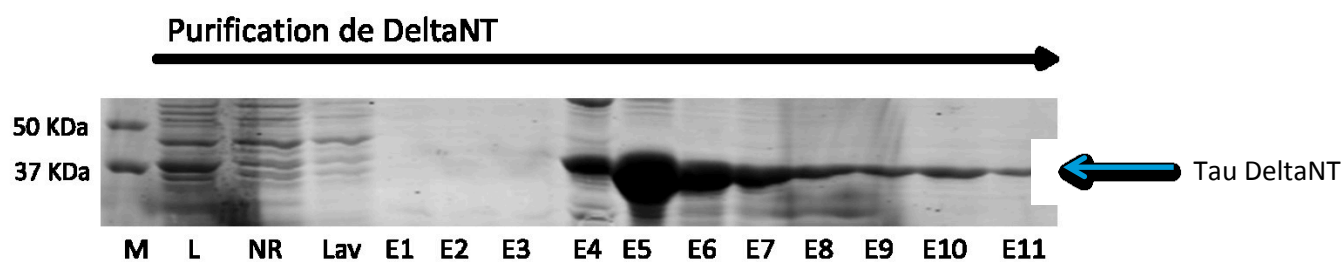


Figure III-4 : Gel dénaturant associé à la purification de Tau 0N recombinante après purification sur colonne Ni-sepharose.



M : Marqueur

L : Lysat bactérien

NR : Fraction contenant les protéines non retenues par la phase fixe lors du passage du lysat

Lav : Fraction contenant les protéines faiblement retenues par la phase fixe et éluées par le tampon de lavage

E1 à E11 : Fractions contenant les protéines retenues par la phase fixe et éluées par le tampon d'éluion

Figure III-5 : Gel dénaturant associé à la purification de la protéine Tau DeltaNT recombinante après purification sur colonne Ni-sepharose.

Une fois les procédés de production et de purification de la protéine Tau 2N mis en place, nous les avons répliqués avec succès sur les autres isoformes de Tau (Figure III-4 et III-5). Nous avons ainsi obtenu des protéines pures et concentrées (figure III-6).

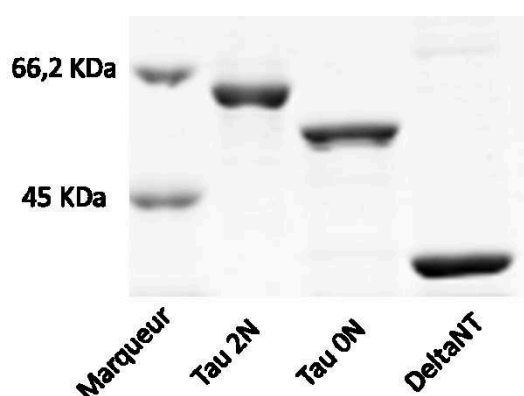
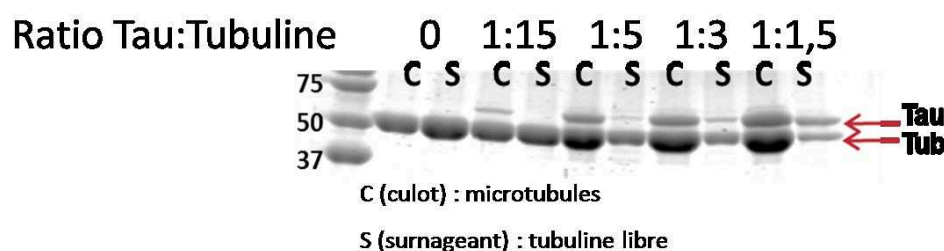


Figure III-6 : Gel dénaturant des trois protéines recombinantes utilisées dans cette étude après purification et concentration.

C. Caractérisation des protéines Tau : exemple de Tau 2N

Une fois les protéines recombinantes obtenues, nous avons vérifié leur fonctionnalité vis-à-vis des MTs par co-sédimentation. La Figure III-7 présente le test de co-sédimentation effectué avec la protéine Tau 2N. Dans les conditions contrôles (sans tau), le culot (C) est constitué de tubuline polymérisée tandis que le surnageant (S) est constitué de tubuline libre et représente la concentration critique (Cc). Lorsque l'on rajoute Tau 2N dans le tampon de polymérisation, on constate que la protéine interagit avec les MTs puisqu'elle est présente dans le culot. A partir du ratio molaire Tau:Tubuline 1:5, la protéine apparaît dans le surnageant, indiquant la saturation des MTs.



Conditions expérimentales :

15 μ M Tubuline
10 mM HEPES-KOH,
4 mM MgCl₂,
20% Glycérol,
30 mM KCl,
1 mM EGTA,
1 mM GTP,
pH = 6,8.

Figure III-7 : Gel dénaturant du test de fonctionnalité de la protéine par cosédimentation de tubuline polymérisée en fonction suivant gradient de Tau 2N.

En utilisant le logiciel Odyssey® Infrared Imaging System (LI-COR Biosciences), nous pouvons quantifier et comparer l'intensité lumineuse des bandes du gel d'électrophorèse (Figure III-8). On observe que l'augmentation de la concentration de Tau 2N induit la diminution progressive de la masse de la tubuline libre et de la concentration critique jusqu'à atteindre une chute de 85 % pour le ratio molaire Tau:Tubuline 1:1,5. A contrario, pour le même ratio molaire, la tubuline polymérisée augmente de 50 %. On en déduit que Tau est fonctionnelle, qu'elle stabilise les MTs et permet d'augmenter la masse de tubuline polymérisée.

Intensité
de
luminescence
des

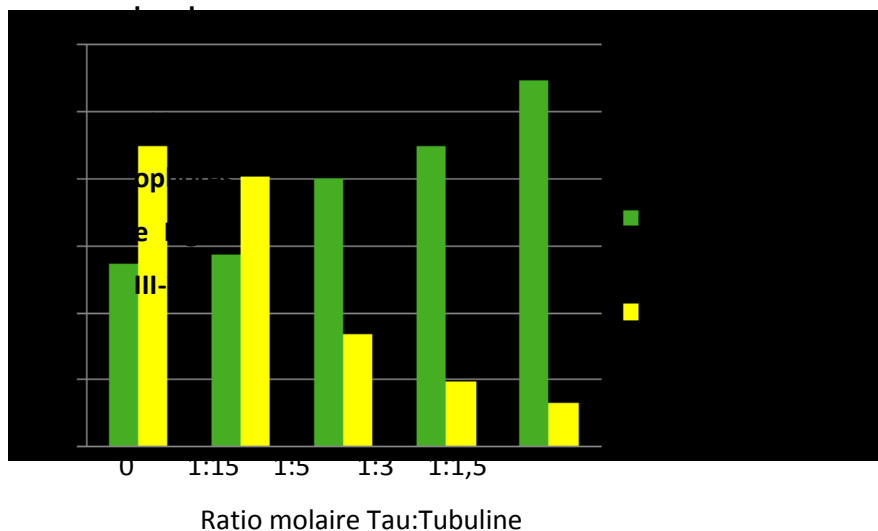


Figure III-8 : Intensité des bandes du gel d'électrophorèse Figure III-7 en fonction du ratio molaire Tau:Tubuline.

D. Tau permet la mise en fagot des MTs *in vitro* via son domaine N-terminal sans encombrement macromoléculaire

1. Influence de Tau 2N sur l'assemblage des microtubules

Sur la Figure III-9, dans les conditions contrôles, nous nous sommes placés dans des conditions proches de la C_c , c'est pourquoi la polymérisation est lente et la valeur au plateau est aussi basse. Cela permet de détecter tout changement subtil dans la vitesse de polymérisation ou la valeur du plateau. Au fur et à mesure que l'on augmente la concentration de Tau, on observe une élévation de la valeur au plateau, jusqu'à un facteur 3. Cela pourrait être dû à l'augmentation de la masse de tubuline polymérisée. En effet, comme on a pu le constater sur la Figure III-8, entre le contrôle et le ratio molaire Tau:Tubuline 1:3, la masse de tubuline polymérisée augmente d'un facteur 1,7 ce n'est pas suffisant pour expliquer un tel accroissement de l'intensité de la diffusion de la lumière. Sachant que cette variable dépend de la taille des objets présents dans la solution (plus un objet est gros, plus il diffuse), on peut envisager que cette hausse pourrait être due à la formation de fagots ou à la formation d'agrégats de tubuline libre. Par ailleurs, sur la Figure III-9, l'allure des courbes de polymérisation semble indiquer que la protéine favorise l'assemblage des MTs, puisque le temps

nécessaire pour atteindre le plateau diminue quand le rapport Tau:Tubuline augmente, ce qui a déjà été rapporté dans la littérature²³⁴.

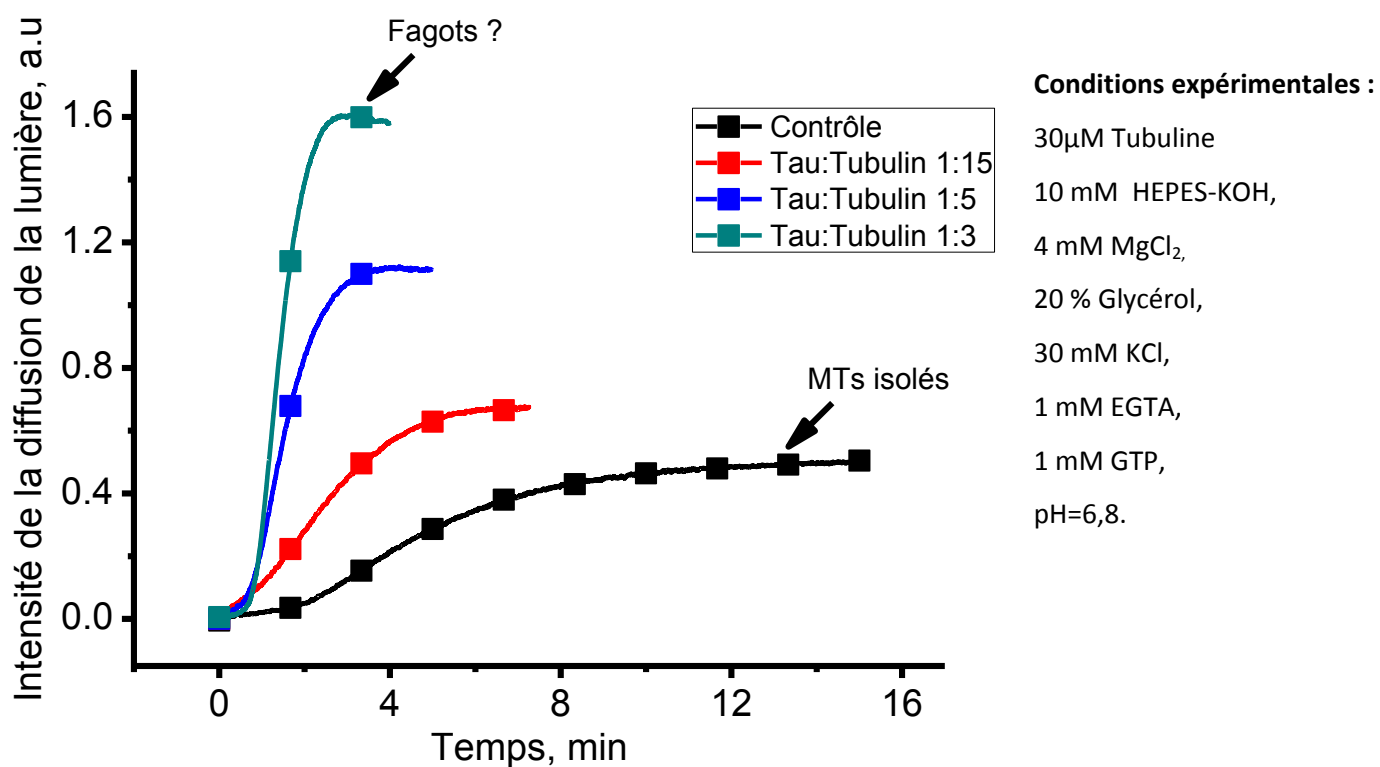


Figure III-9 : Assemblage de la Tubuline suivi par turbidimétrie en fonction du ratio molaire Tau:Tubuline.

Nous avons décidé d'utiliser la microscopie AFM afin de déterminer l'origine de l'augmentation du plateau (agrégats de tubuline ou fagots de MTs). Pour ce faire, nous avons polymérisé des MTs et une fois l'équilibre atteint, nous les avons stabilisés avec 5 µM de taxol. D'un côté pratique, le taxol nous permet d'obtenir des images de meilleures qualités. En effet, le taxol diminue considérablement la Cc et donc il nous permet d'obtenir des surfaces plus propres à imager et donc de meilleure résolution. Nous observons donc uniquement les effets de Tau sur l'architecture des MTs et puisqu'il n'y a plus de tubuline libre, la variation de la masse de tubuline polymérisée est en fonction du gradient de Tau est écartée. Finalement, afin de limiter les éventuelles compétitions entre Tau et le taxol, les MTs sont polymérisés en présence de Tau, puis le Taxol est ajouté lorsque l'état stationnaire est atteint (i.e. après la fixation de Tau).

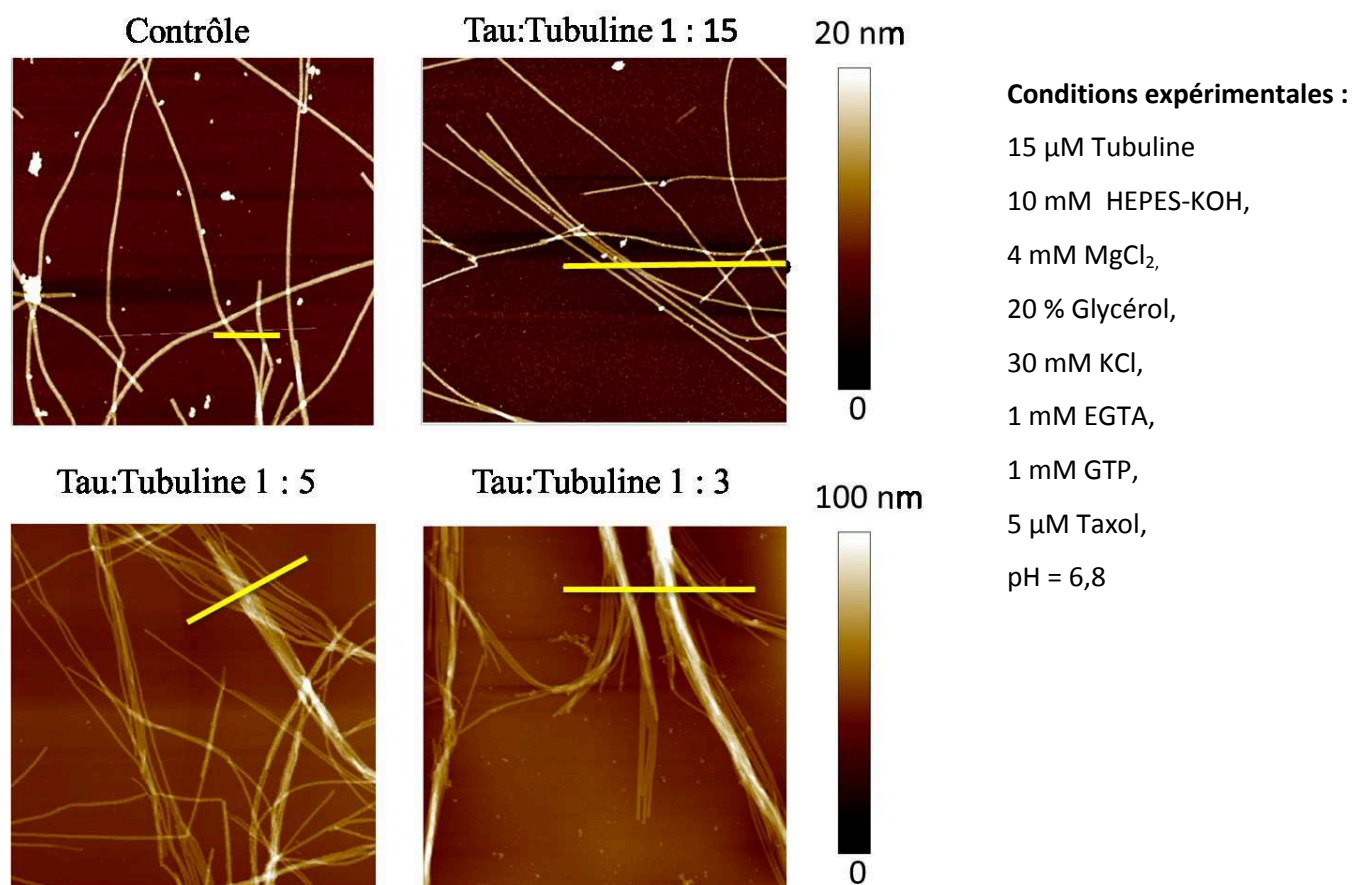


Figure III-10 : Images AFM de $5 \mu\text{m}^2$ de microtubules assemblés pendant 30 min à 37°C en présence d'un gradient de Tau 2N.

Sur la Figure III-10, nous constatons que plus la concentration en protéine Tau est importante, plus les MTs adoptent une orientation parallèle. Cela signifie que l'augmentation du plateau de MTs sur la Figure III-9 était due à des MTs alignés en fagots. Outre cette géométrie particulière qui conduit à une diffusion plus importante, on remarque que les objets détectés sont plus gros. Grâce au logiciel d'analyse de l'AFM (Nanoscope Analysis®), il est également possible d'obtenir les profils de la hauteur des objets déposés sur nos échantillons (Figure III-11). En présence de Tau, les MTs sont plus hauts, ils diffractent plus la lumière que les MTs isolés, ce qui conduit à une valeur au plateau plus élevée. Par ailleurs, nous constatons que Tau agit dès un ratio molaire Tau:Tubuline de 1:15, ce qui est concordant avec l'expérience réalisée Figure III-9.

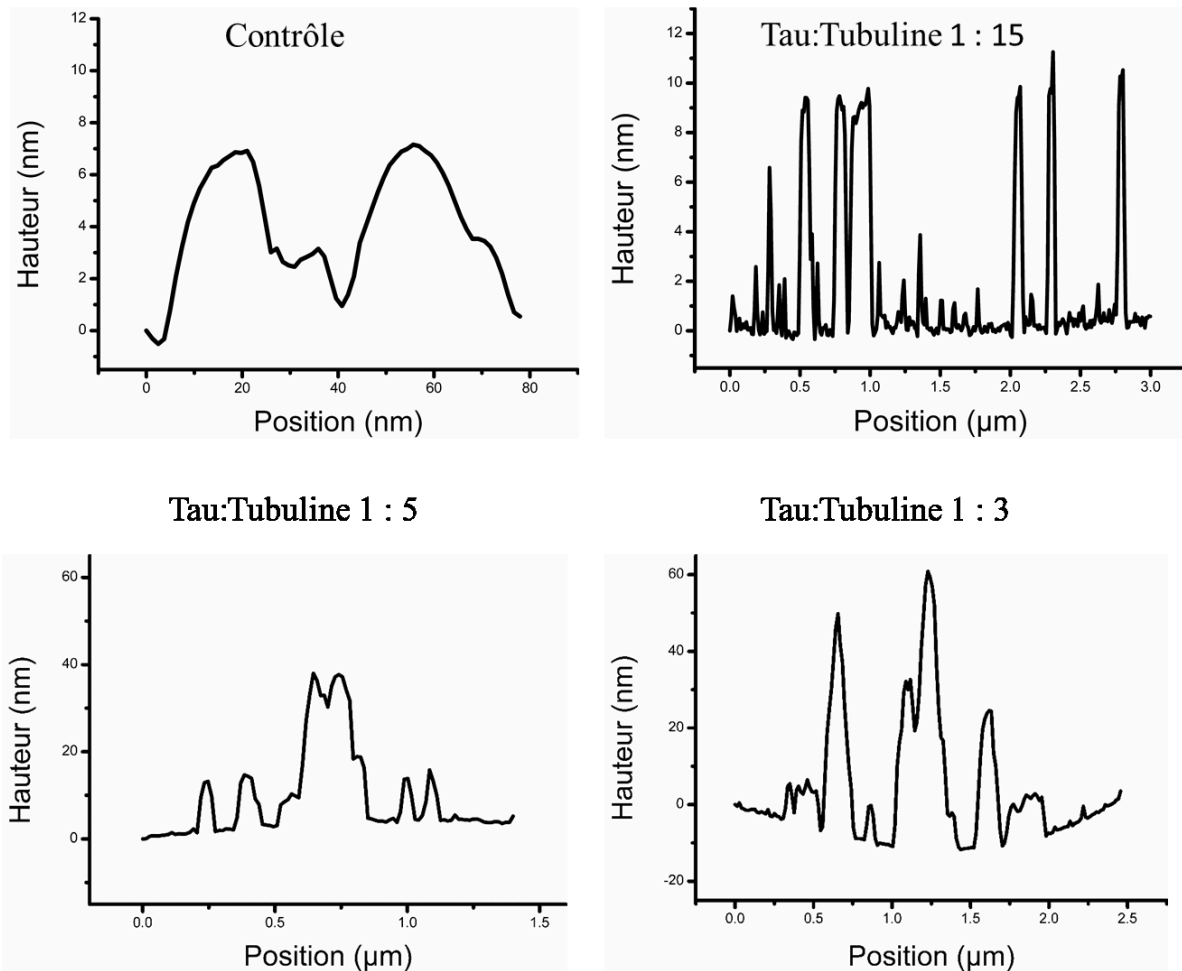


Figure III-11 : Profil de hauteurs associé à la Figure III-10

A la suite de ces observations, nous avons essayé de déterminer à quel ratio molaire Tau:Tubuline la transition entre MTs isolés et MTs en fagots avait lieu par microscopie optique sur des MTs préalablement stabilisés avec 5 μM de taxol. L'avantage de la microscopie optique est qu'elle permet de faire une analyse plus large, même si la résolution (200 à 300 nm) n'autorise pas à statuer sur l'organisation des MTs dans le fagot.

Pour ce faire, nous avons déposé des MTs polymérisés en présence de concentrations connues de Tau sur des micas que nous avons marqués à l'aide d'anticorps. Puis, nous avons quantifié la mise en fagots des MTs en comparant 60 intensités de fluorescence grâce à un test de Kruskal-Wallis (Figure III-12) (cf matériels et méthodes).

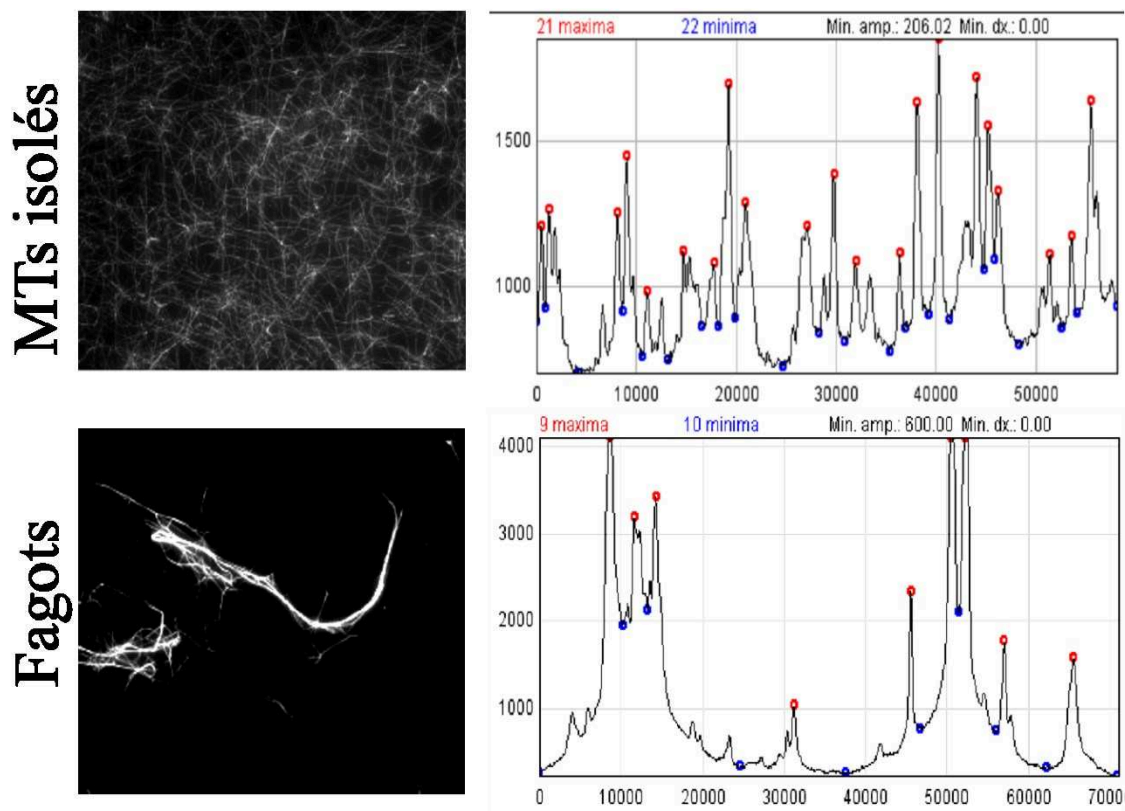


Figure III-12 : (*Haut*) MTs polymérisés en présence d’une faible concentration de Tau 2N et stabilisés avec 5 μ M de taxol et profil d’intensité de fluorescence associé. (*Bas*) La même expérience a été réalisée mais, en présence d’une concentration de Tau 2N élevée favorisant la formation de fagots. Le profil d’intensité associé est beaucoup plus accidenté.

Les résultats présentés sur la Figure III-13 montrent que le taux de MTs en fagot augmente avec le ratio molaire Tau:Tubuline. Cependant, on peut considérer qu’il n’y a pas de différences significatives entre le contrôle et les ratios molaires Tau:Tubuline 1:60 et 1:30. En effet, pour ces trois populations, la grande majorité des MTs est isolée. De plus, on observe une augmentation du ratio de l’intensité de fluorescence à partir du ratio molaire Tau:Tubuline 1:15. On considère qu’à partir de ce ratio, la majorité des MTs sont en fagots. On en déduit qu’il y a une transition entre les ratios molaires Tau:Tubuline 1:30 où la majorité des MTs est isolée, et 1:15 où on constate une mise en fagots massive des MTs.

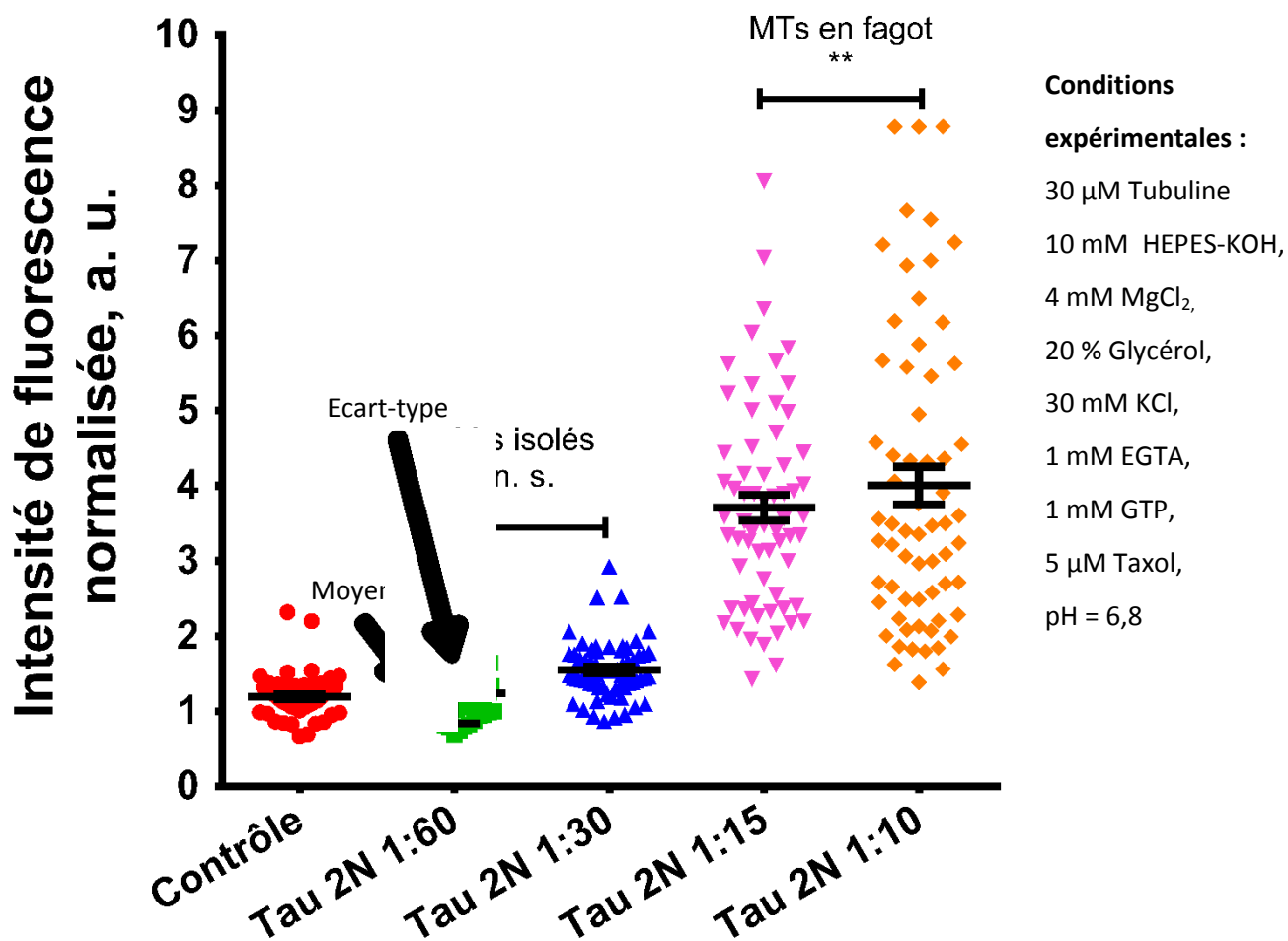


Figure III-13 : Nuage de points représentant l'intensité de fluorescence de MTs stabilisés avec 5 μ M de taxol déposé sur du mica en fonction d'un gradient de Tau 2N et analysés grâce à un test de Kruskal-Wallis (60 points).

2. Rôle critique de la partie N-terminale dans la mise en fagots des MTs sans encombrement macromoléculaire

Nous avons mis en évidence durant les expériences précédentes que Tau 2N était capable d'initier la mise en fagots de MTs. Dès lors, nous avons entrepris d'analyser le rôle du domaine N-terminal dans ce processus. Pour cela, nous avons ensuite détecté par turbidimétrie les différences entre les trois isoformes sur l'organisation des MTs. Dans un premier temps, nous avons suivi la variation de l'intensité de diffusion de 30 μM de tubuline polymérisée à 37°C puis stabilisés avec 5 μM de taxol une fois que les MTs étaient arrivés à l'état stationnaire. Une fois les MTs stabilisés, nous avons ajouté des concentrations croissantes de Tau afin d'étudier la variation de l'intensité de la diffusion de la lumière (Figure III-14).

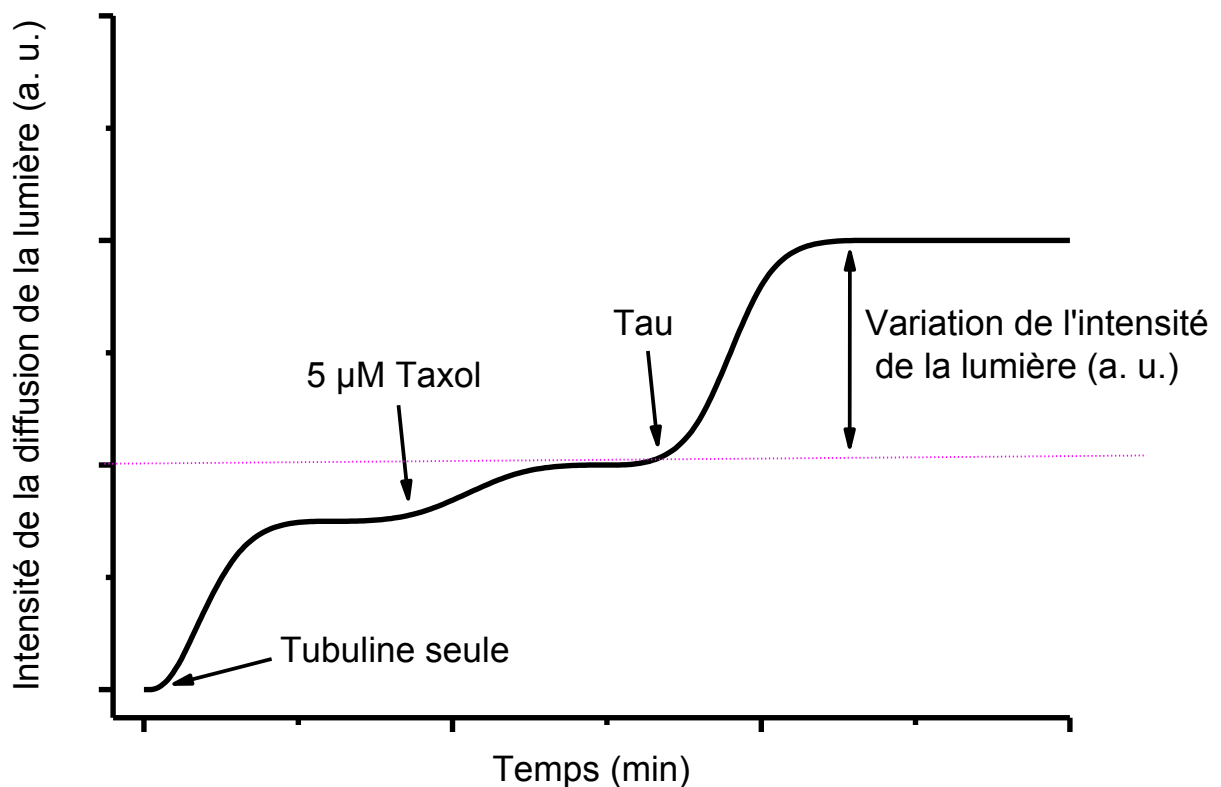


Figure III-14 : Méthode de la détermination de la variation de l'intensité de la diffusion de la lumière en présence de Tau sur des MTs stabilisés avec 5 μM de Taxol.

Ainsi, sur la Figure III-15, le point $t=0$ représente les MTs stabilisés avec du taxol une fois l'équilibre atteint. Nous avons ensuite observé la variation de l'intensité de la diffusion de la lumière lorsque l'on applique un gradient de Tau sous ses différents isoformes. Les MTs étant stabilisés, l'augmentation de la diffusion est due à la formation de fagots car la masse de MTs ne change pas (il n'y a pas de tubuline libre).

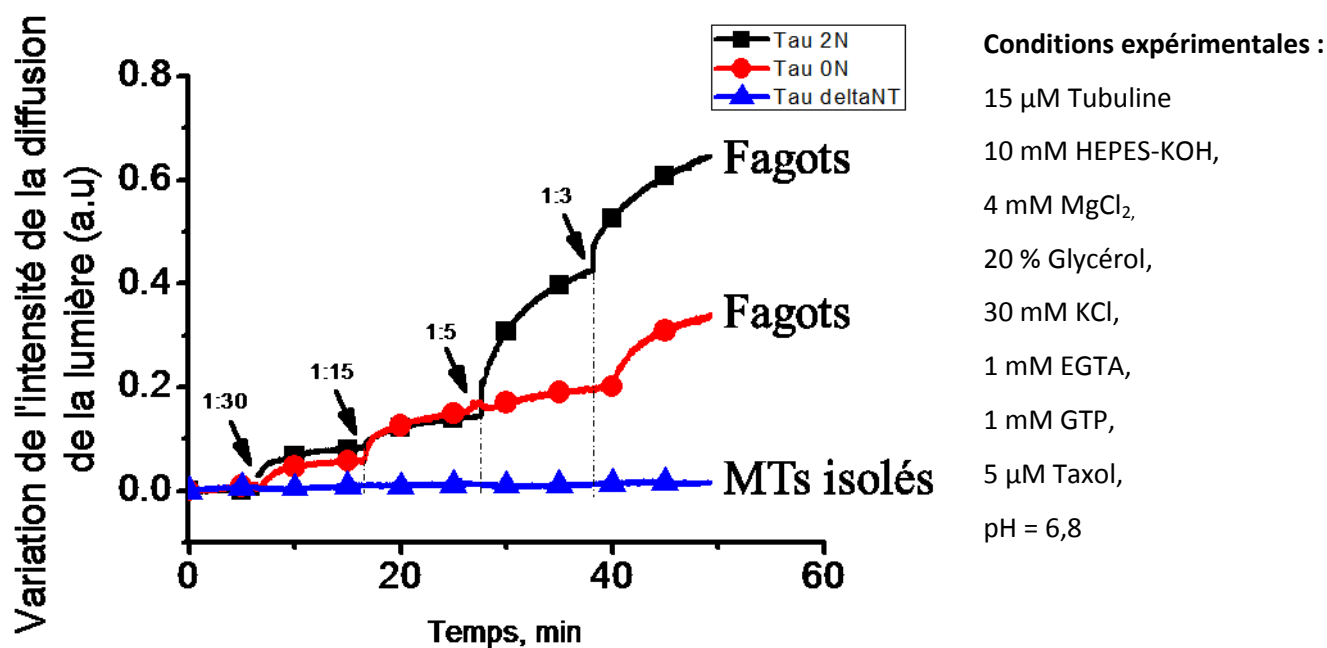


Figure III-15 : Formation de fagots suivie par turbidimétrie en présence d'un gradient du ratio molaire Tau:Tubuline en fonction des trois isoformes de Tau.

La Figure III-15 indique que l'ajout de Tau 2N et de Tau 0N induit des augmentations régulières de l'intensité de la diffusion de la lumière contrairement à l'ajout de DeltaNT. On en déduit que sans sa partie N-terminale, Tau est incapable de former des fagots.

Cette expérience a ensuite été reproduite pour observer les objets par AFM. Cependant, nous avons choisi de ne travailler qu'avec le rapport Tau:Tubuline 1:15 pour les trois isoformes, afin de nous placer au début du processus de mise en fagot, nous permettant ainsi d'observer des objets de faible hauteur dans lesquels on pourrait détecter des différences potentielles d'espacement entre MT selon l'isoforme.

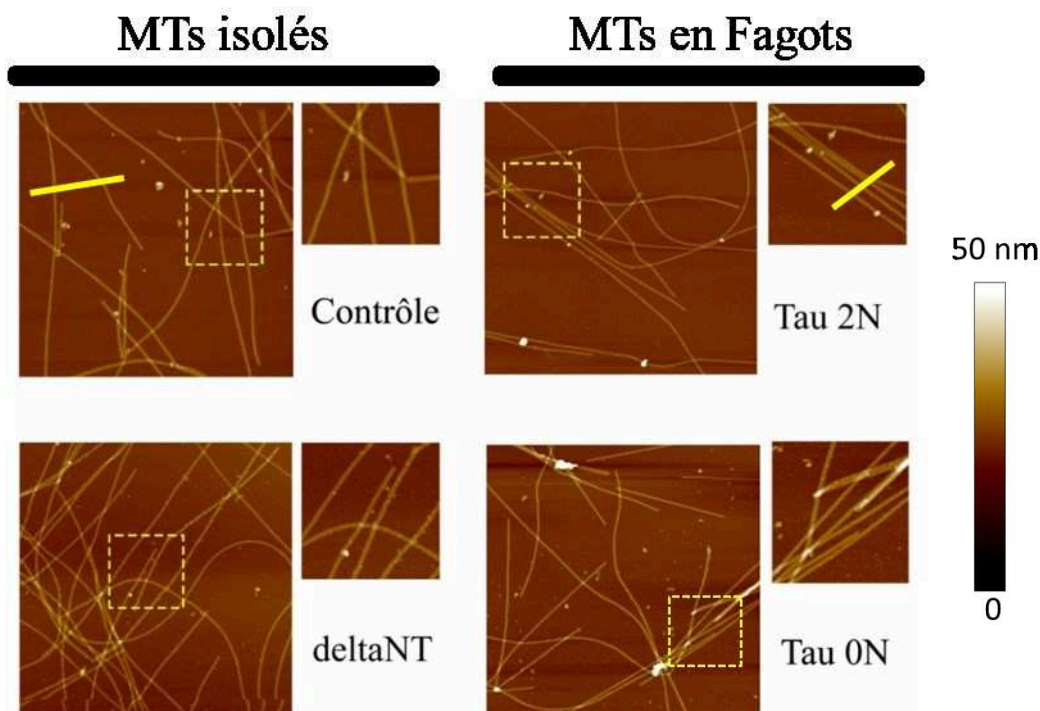


Figure III-16 : Images AFM de $5 \times 5 \mu\text{m}^2$ (et agrandissements) de microtubules assemblés pendant 30 min à 37°C avec les différents isoformes de Tau (Ratio molaire Tau:Tubuline 1:15).

Ainsi, comme on peut le constater Figure III-16, la microscopie AFM nous a permis de vérifier que :

- DeltaNT ne permettait pas d'induire des fagots
- En présence d'un ratio molaire Tau:Tubuline 1:15 de Tau 2N et Tau 0N, les MTs sont alignés dans la même direction, ce qui pourrait être les prémices de la formation de fagot. Ces objets, bien que peu compacts, pourraient expliquer la différence de variation de l'intensité de la diffusion de la lumière, puisque des objets plus gros sont détectés.

Par ailleurs, nous pouvons ainsi constater Figure III-17, qu'à un ratio Tau:Tubuline 1:15, sur le contrôle, les objets visualisés ont en moyenne une hauteur de 10 nm. Cette hauteur est caractéristique des MTs isolés observés par AFM. En effet, bien que la hauteur classique d'un MT soit de 25 nm, elle est inférieure en AFM à cause de la préparation des échantillons qui « écrase » les MTs sur la surface. Cela signifie que les fagots de Tau 2N et Tau 0N se sont étalés sur la surface lors de la préparation de l'échantillon. Nous n'avons remarqué aucune différence statistique sur la hauteur des

objets observés à cette concentration. En revanche, on remarque des différences significatives dans l'espacement entre l'isoforme Tau 2N (ou 0N) et le contrôle.

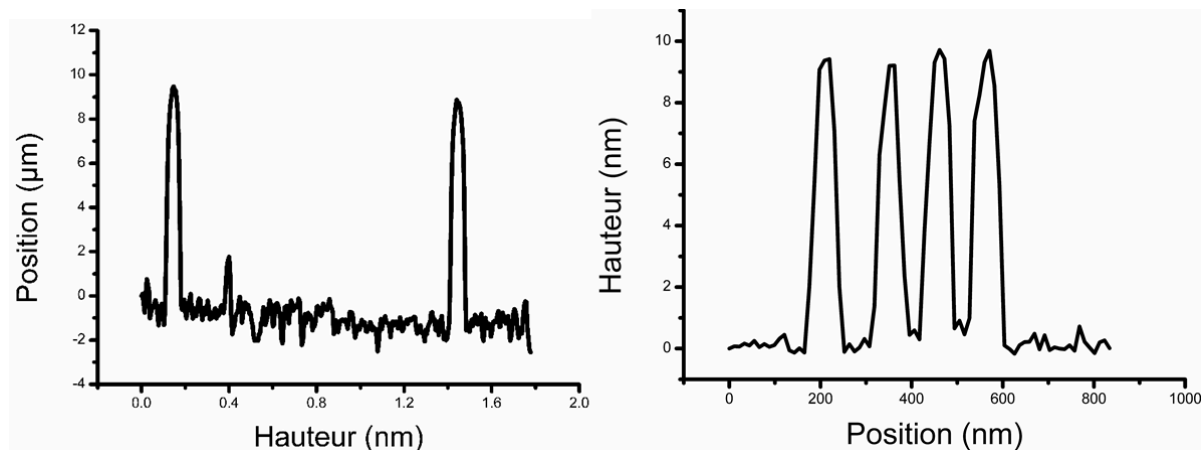


Figure III-17 : Exemple de Profil des Hauteurs des MTs (Figure III-16) réalisé le long de la ligne jaune à partir de l'image AFM du contrôle.

3. Importance de la force ionique sur la mise en fagot

Les résultats précédents montrent que la partie N-terminale de Tau joue un rôle critique dans la formation de fagots en présence de Tau. Puisque ce domaine est composé de clusters de résidus alternativement chargés positivement et négativement, nous nous sommes demandés si la présence de sels pouvait perturber la mise en fagots de MTs induite par Tau. En effet, si le modèle du cross-bridge s'applique, un tampon à forte force ionique ($I = \frac{1}{2} \sum_i c_i z_i^2$, où c_i est la concentration de l'ion i et z_i la valence de l'ion i) devrait perturber la dimérisation du domaine N-terminal.

De ce fait, nous avons étudié l'impact d'un gradient de KCl sur des MTs stabilisés avec 5 µM de Taxol en présence de Tau 2N. A $t=0$, les MTs ont été polymérisés dans un tampon à 30 mM de KCl en présence d'un ratio molaire Tau:Tubuline 1:3, ils sont donc en fagots (ce qui explique la valeur initiale élevée du plateau). On constate qu'au fur et à mesure que l'on rajoute du KCl dans le tampon, l'intensité de la diffusion de la lumière diminue (Figure III-18). En effet, en multipliant par 5 la concentration en KCl, on passe d'une force ionique de 50 mM à 150 mM qui se traduit par une perte

d'environ 30 % du signal. Les fagots de MTs formés en présence de Tau sont donc sensibles à la force ionique.

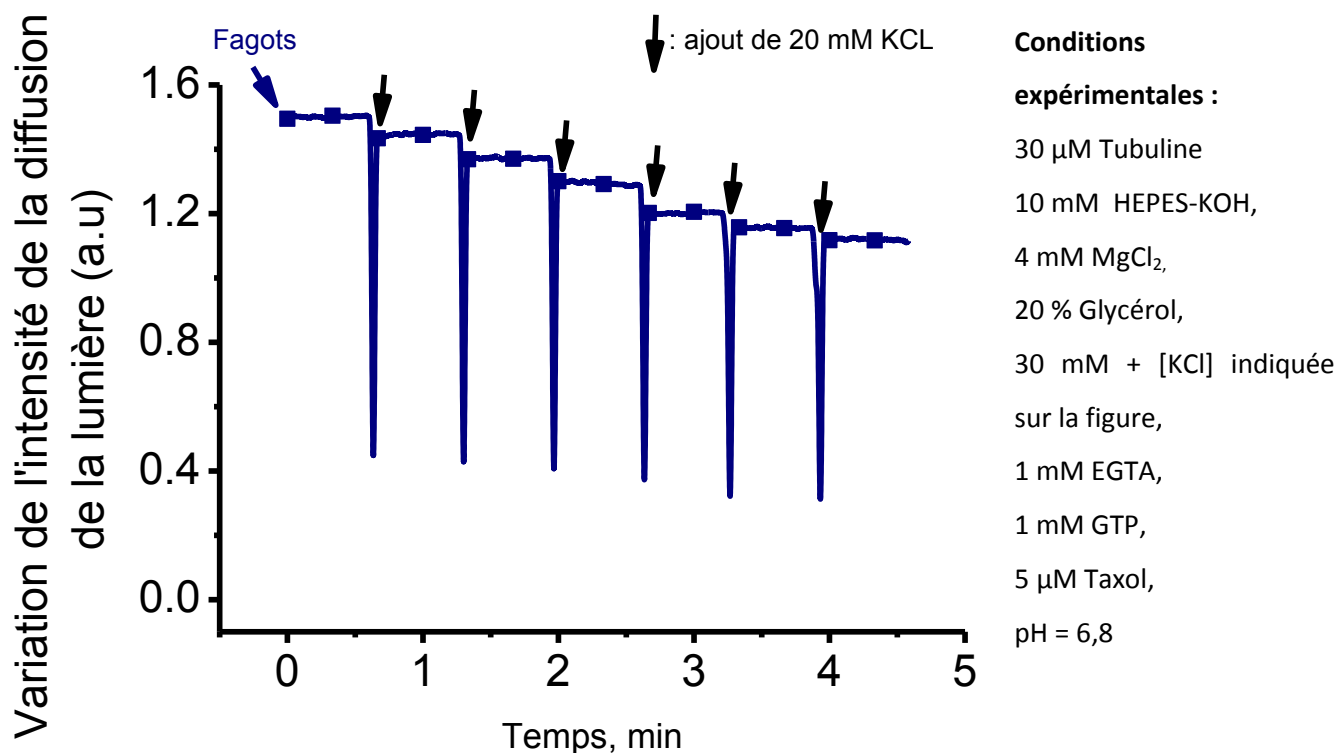


Figure III-18 : Effet d'un gradient de KCl sur des MTs polymérisés avec un ratio molaire Tau:Tubuline 1:3 en présence de 5 μ M de taxol.

Ce résultat peut être causé par deux possibilités :

- Tau reste fixée sur les MTs mais l'ajout de KCl dans le tampon dissocie les ponts électrostatiques formés par sa partie N-terminale.
- La liaison de Tau aux MTs étant elle-même partiellement due à des liaisons électrostatiques, l'ajout de KCl diminue l'affinité de Tau pour les MTs. Tau se détache et ainsi la probabilité de former des ponts salins est réduite.

Pour tester la seconde possibilité, nous avons effectué une expérience de co-sédimentation en appliquant à des MTs stabilisés avec 5 μ M de Taxol un gradient de KCl en présence de Tau (ratio molaire Tau:Tubuline 1:15).

Sur la fFigure III-19, on constate qu'au fur et à mesure que [KCl] augmente, la bande de Tau bascule petit à petit dans le surnageant. En effet, à 30 mM de KCl 100 % de Tau se trouve dans le culot (C),

alors qu'à 120 mM de KCl, il y a 66% de Tau dans le surnageant (S) et seulement 34% dans le culot (fFigure III-20). On en déduit que sous l'effet d'une forte concentration en sels, une partie de Tau se détache effectivement des MTs et par conséquent, ne contribue plus à la mise en fagot. Enfin, dans nos conditions expérimentales, les MTs ne semblent pas affectés par le gradient de KCl.

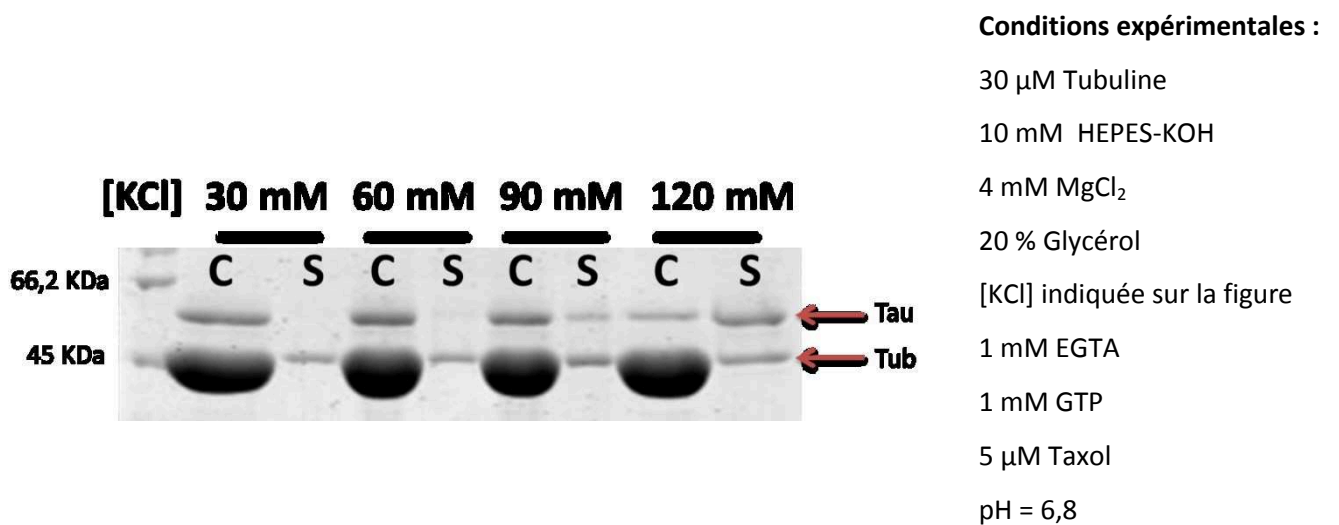
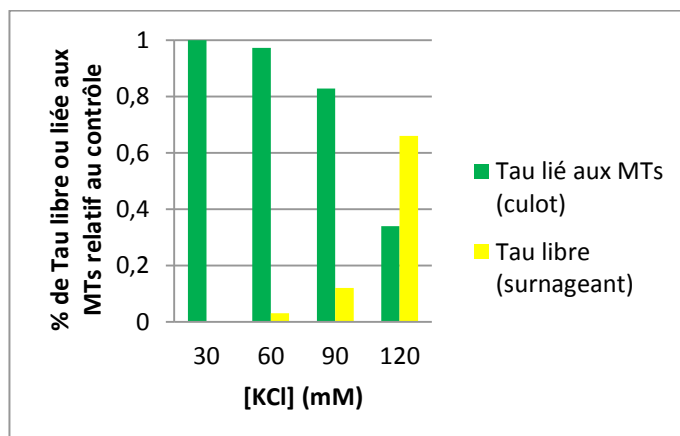


Figure III-19 : Gel dénaturant associé à la co-sédimentation de MTs polymérisés en présence d'un ratio molaire Tau:Tubuline 1:15 et stabilisés avec 5 μ M de taxol à l'équilibre. Puis, un gradient de KCl leur a été appliqué.

**Conditions expérimentales :**30 μ M Tubuline

10 mM HEPES-KOH

4 mM $MgCl_2$

20 % Glycérol

[KCl] indiquée sur la figure

1 mM EGTA

1 mM GTP

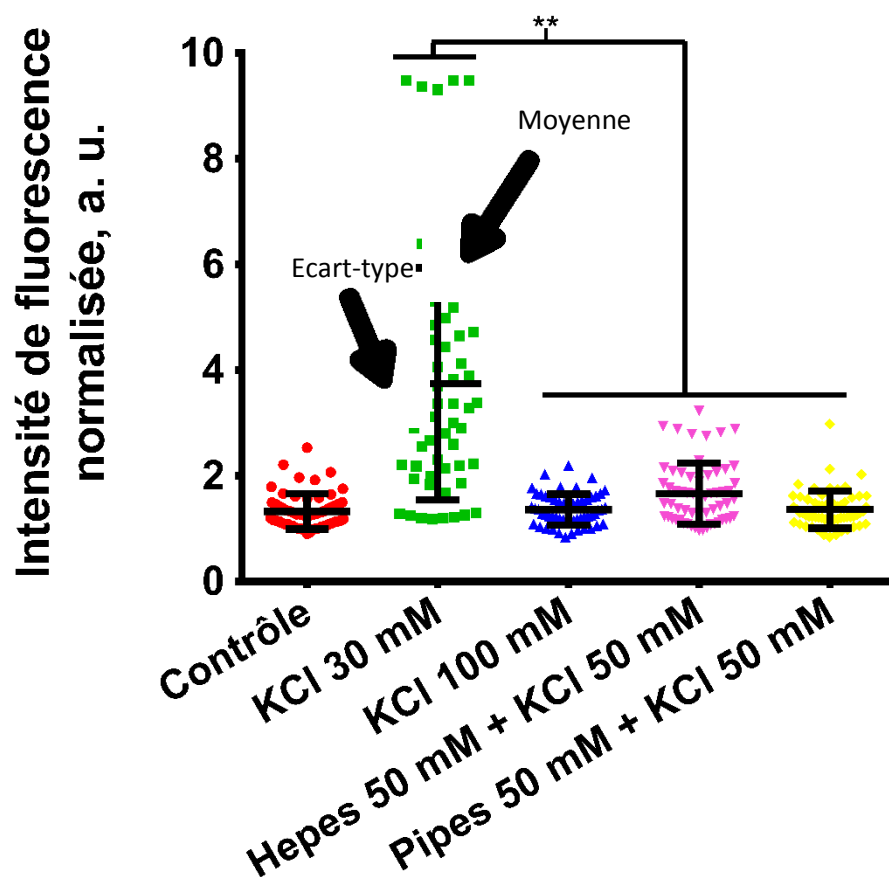
5 μ M Taxol

pH = 6,8

Figure III-20 : Intensités des bandes du gel fFigure III-19 pour Tau libre (S) et Tau liée aux MTs (C) rapportées au contrôle (KCl 30mM) en fonction d'un gradient de KCl (ratio molaire Tau:Tubuline 1:15).

Nous nous sommes alors intéressés à la force ionique ajoutée par les tampons les plus communément utilisés en biologie. En effet, ils sont basés sur des acides amino-alcano-sulfoniques où sont présents des zwitterions (ions dipolaires) tels que l'HEPES, le MES ou le PIPES. La présence de ces ions dipolaires peut également perturber la formation de ponts électrostatiques, notamment à fortes concentrations.

Nous nous sommes donc demandés si les différences de régimes (attraction, absence d'attraction, répulsion) observés dans la littérature étaient dues aux tampons utilisés^{4,160,235,236}. Sur la fFigure III-21, conformément aux résultats précédents, on constate que si la force ionique dépasse 120 mM on diminue la propension à former des fagots (Tableau III-1).



Conditions

expérimentales :

10 mM HEPES-KOH sauf si indiqué autrement sur la figure,
 4 mM MgCl₂,
 20 % Glycérol,
 [KCl] à 30 mM pour le contrôle, indiquée sur la figure pour les autres conditions,
 1 mM EGTA,
 1 mM GTP,
 5 μM Taxol,
 pH = 6,8

Figure III-21 : Analyses statistiques de MTs stabilisés avec 5 μM de taxol polymérisés en présence ou non de Tau 2N dans des tampons de force ionique différente (ratio molaire Tau:Tubuline 1:15). Les résultats proviennent d'un test de Student bilatéral réalisé sur un échantillon n=60 (**p<0,01).

Echantillon	I (M)
Contrôle (Hepes 10, KCl 30 mM)	0,05
KCl 50 mM	0,07
KCl 100 mM	0,12
Pipes 50 mM + KCl 50 mM	0,15
Hepes 50 mM + KCL 50 mM	0,15

(A)

- Exemple de calcul de la force ionique (Contrôle : Hepes 10, KCl 30 mM)

Ions	Z_i	C (M)	Z_i^2
K+	1	0,03	1
Cl-	1	0,03	1
(Hepes) $R_1 = SO_3^-$	1	0,01	1
(Hepes) $R_1 = NH^+$	1	0,01	1
(Hepes) $R_2 = OH^-$	1	0,01	1
(Hepes) $R_2 = NH^+$	1	0,01	1

(B)

$$\mu_{\text{contrôle}} = \frac{1}{2} (0,03 + 0,03 + 4 \times 0,01) = 0,05 \text{ M}$$

Tableau III-1 : (A) Force ionique du tampon en fonction des échantillons de la fFigure III-21

(B) Exemple de calcul de la force ionique (Contrôle : Hepes 10, KCl 30 mM)

Les résultats obtenus permettent d'éclaircir les différences de régimes constatées dans la littérature. En effet, la présence de zwitterions à des concentrations élevées (HEPES, PIPES ou MES >50 mM) ou de sels monovalents (> 75 mM) dans le tampon altère la mise en fagot arbitrée par Tau 2N. Ces observations expliquent pourquoi ce phénomène n'a pas été détecté dans certains articles. C'est notamment le cas de Brandt et Lee¹⁶⁰ ou de Choi *et al*²³⁵ qui ont réalisé leurs expériences dans du BRB80 contenant 80 mM de PIPES contrairement à Rosenberg *et al*⁴ et Scott *et al*²³⁶ qui travaillaient respectivement à 1 mM de PIPES et 20 mM de MES. Ce constat est en accord avec les conclusions de Aamodt et Culotti²³⁷ qui remarquèrent l'apparition de fagots après dessalage de MTs polymérisés dans un tampon avec 100 mM de PIPES en présence de MAPs (fFigure III-22).

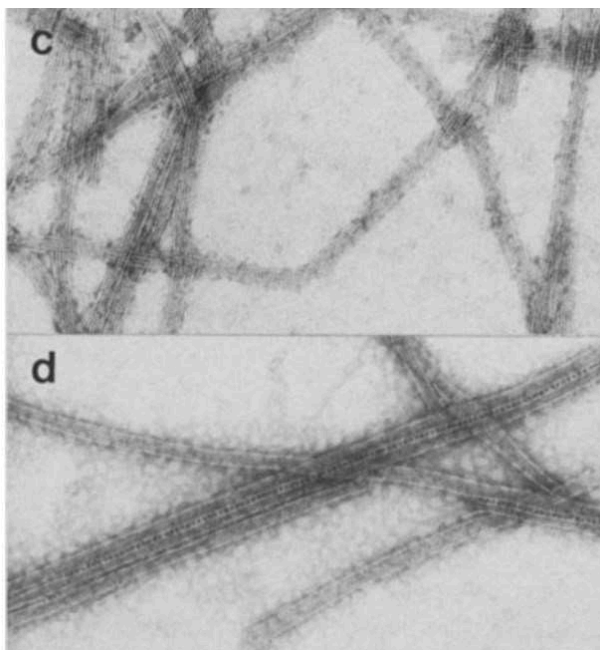


Figure III-22 : Dissociation et reformation de fagots en présence de MAPs. c) avant dessalage d) après dessalage. Image issue de l'article d'Aamodt et Culotti (1986)²³⁷.

Néanmoins, nous ne pouvons pas exclure la possibilité que l'augmentation de la force ionique réduise l'affinité de Tau pour les MTs ce qui, à son tour, diminuerait la probabilité de former des ponts électrostatiques. En effet, la formation de cross-bridges et la fixation de Tau aux MTs sont toutes les deux en partie basées sur des interactions électrostatiques.

E. Analyses de l'apparition des fagots de MTs suite à l'expression de Tau dans des cellules HeLa

Outre les expériences *in vitro*, le paradigme du cross-bridge est justifié dans la littérature par le fait que la surexpression de Tau dans des cellules mammifères non neuronales entraîne l'apparition de fagots^{147,147,164,166}. Néanmoins, cet argument peut être nuancé par :

- Le fait que des fagots puissent être observés en l'absence du domaine de projection de Tau²³⁸, ce qui est surprenant puisqu'il serait responsable de leur formation *in vitro*,
- Le fait que la présence de Taxol soit suffisante pour déclencher le regroupement des MTs. Cela pourrait signifier que la seule stabilisation des MTs pourrait induire la mise en fagot²³⁹.
- Enfin, il pourrait s'agir d'un artefact de transfection. En effet, beaucoup de partenaires microtubulaires permettent de générer des fagots de MTs lorsqu'ils sont surexprimés bien que ce ne soit pas leurs fonctions primaires. C'est notamment le cas pour la protéine EB1 qui reconnaît spécifiquement les extrémités « plus », lorsqu'elle est surexprimée dans les cellules²⁴⁰. De façon plus paradoxale, Il en est de même pour la spastine dont le rôle est de couper les MTs²⁴¹.

Dès lors, pour mieux comprendre le rôle de Tau dans un contexte cellulaire, nous avons analysé la formation de fagots en fonction du ratio de l'intensité de fluorescence Tau:Tubuline. Ce paramètre, que nous avons appelé ratio critique, devrait refléter le ratio molaire Tau:Tubuline, il est par conséquent plus informatif que le pourcentage de cellules ayant des MTs en fagots.

En procédant de la sorte, nous avons obtenu dans des cellules HeLa, des résultats conformes à ceux présentés dans la littérature. Nous avons observé qu'en cellulaire, la présence de la partie N-terminale de Tau n'était pas nécessaire à la mise en fagot des MTs. En effet, nous avons constaté que peu importe la longueur de la partie N-terminale de la construction surexprimée, des fagots de MTs étaient présents dans les cellules. En effet, sur la fFigure III-23, on constate que :

- A faible ratio, les MTs sont isolés.
- A fort ratio, les MTs sont en fagots.

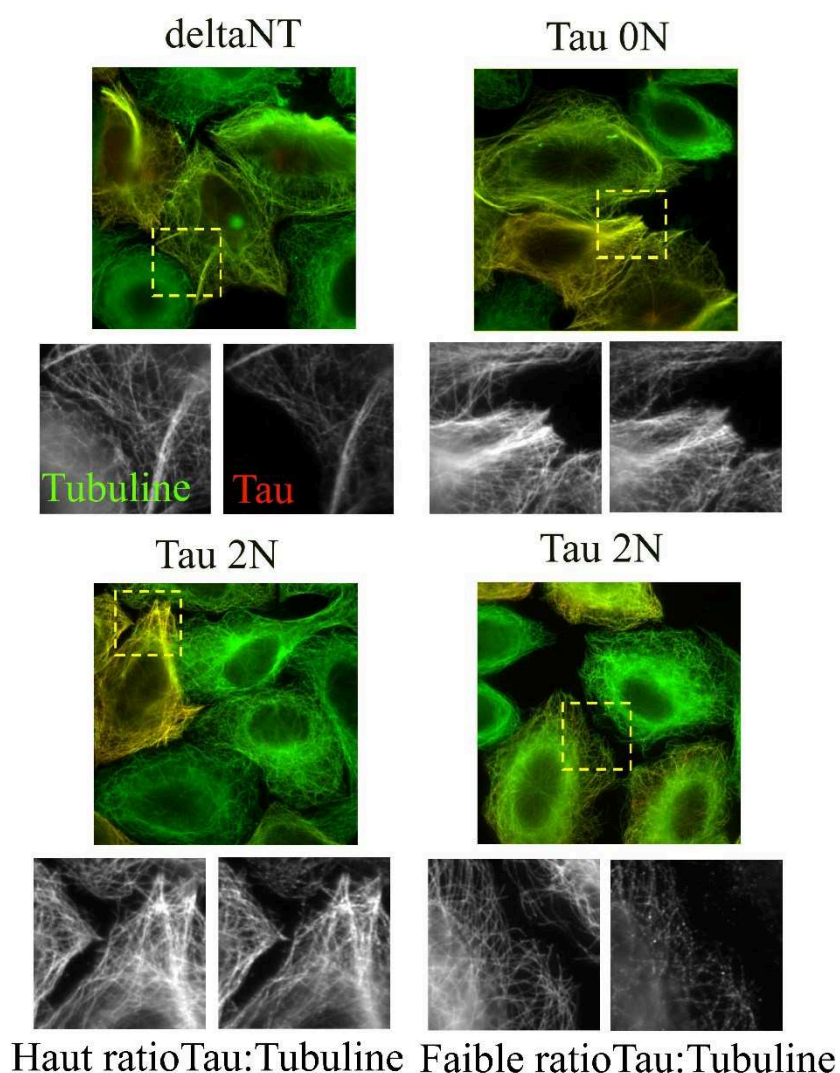


Figure III-23 : Images de microscopie à fluorescence de cellules HeLa exprimant Tau 2N, Tau 0N, et deltaNT. Les anticorps anti-tubuline et anti-tau sont respectivement marqués en vert et rouge.

Suite au constat que toutes les cellules où la protéine était fortement exprimée présentaient des fagots, nous avons décidé d'explorer l'effet de la concentration de Tau sur l'organisation des MTs. Dès lors, nous avons défini une variable permettant d'établir le seuil d'expression de la protéine à partir duquel la majorité des MTs sont en fagots. Nous avons ainsi défini un paramètre appelé « ratio critique de fluorescence Tau:Tubuline » qui représente le ratio de fluorescence Tau:Tubuline pour lequel 50 % des cellules ont des MTs en fagots (Figure III-24).

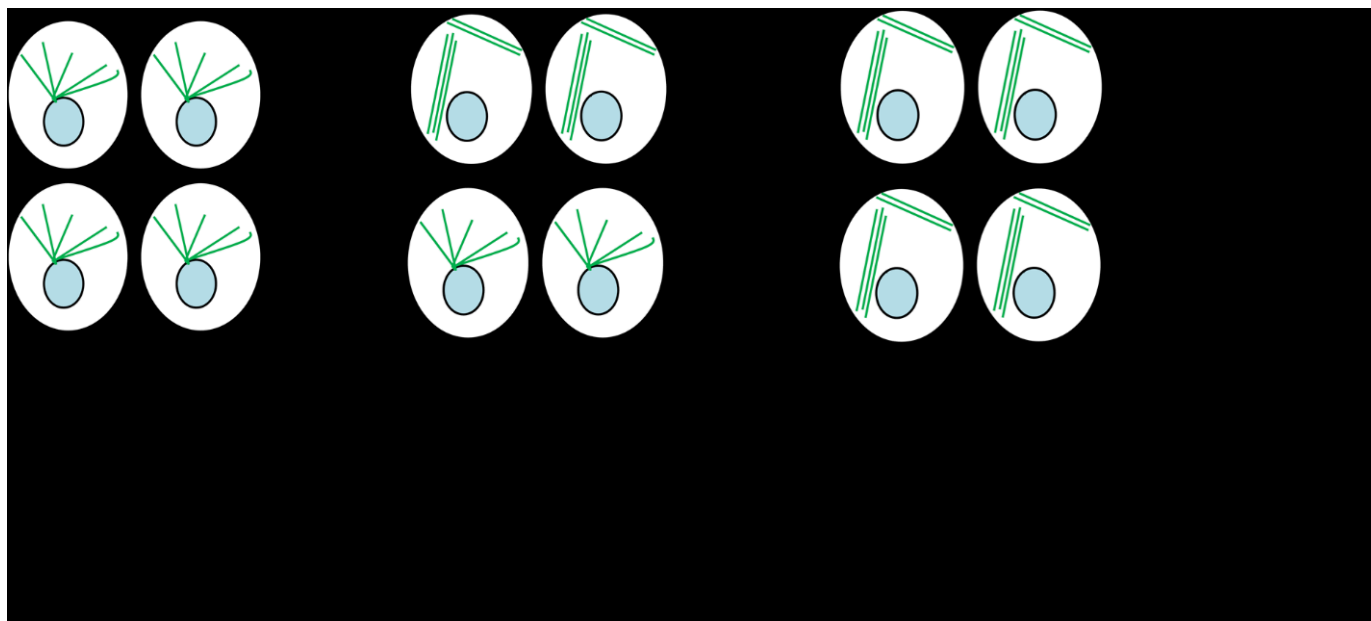


Figure III-24 : Méthode de détermination du ratio critique de fluorescence Tau:Tubuline (les valeurs indiquées ont été choisies arbitrairement).

Ainsi, sur la fFigure III-25, les ratios de fluorescence Tau:Tubuline de 50 cellules ont été mis en regard avec la mise en fagot (voir chapitre II section VI) ce qui nous a permis de constater des différences entre les isoformes Tau 2N, Tau 0N et DeltaNT. En effet, on remarque que la mise en fagot apparait à un niveau d'expression significativement plus élevé pour Tau 2N (ratio critique = $1,15 \pm 0,3$), que pour Tau 0N (ratio critique = $0,82 \pm 0,2$), et que pour DeltaNT (ratio critique = $0,6 \pm 0,2$). Ces résultats suggèrent que la partie N-terminale de Tau limite de façon progressive la mise en fagot des MTs.

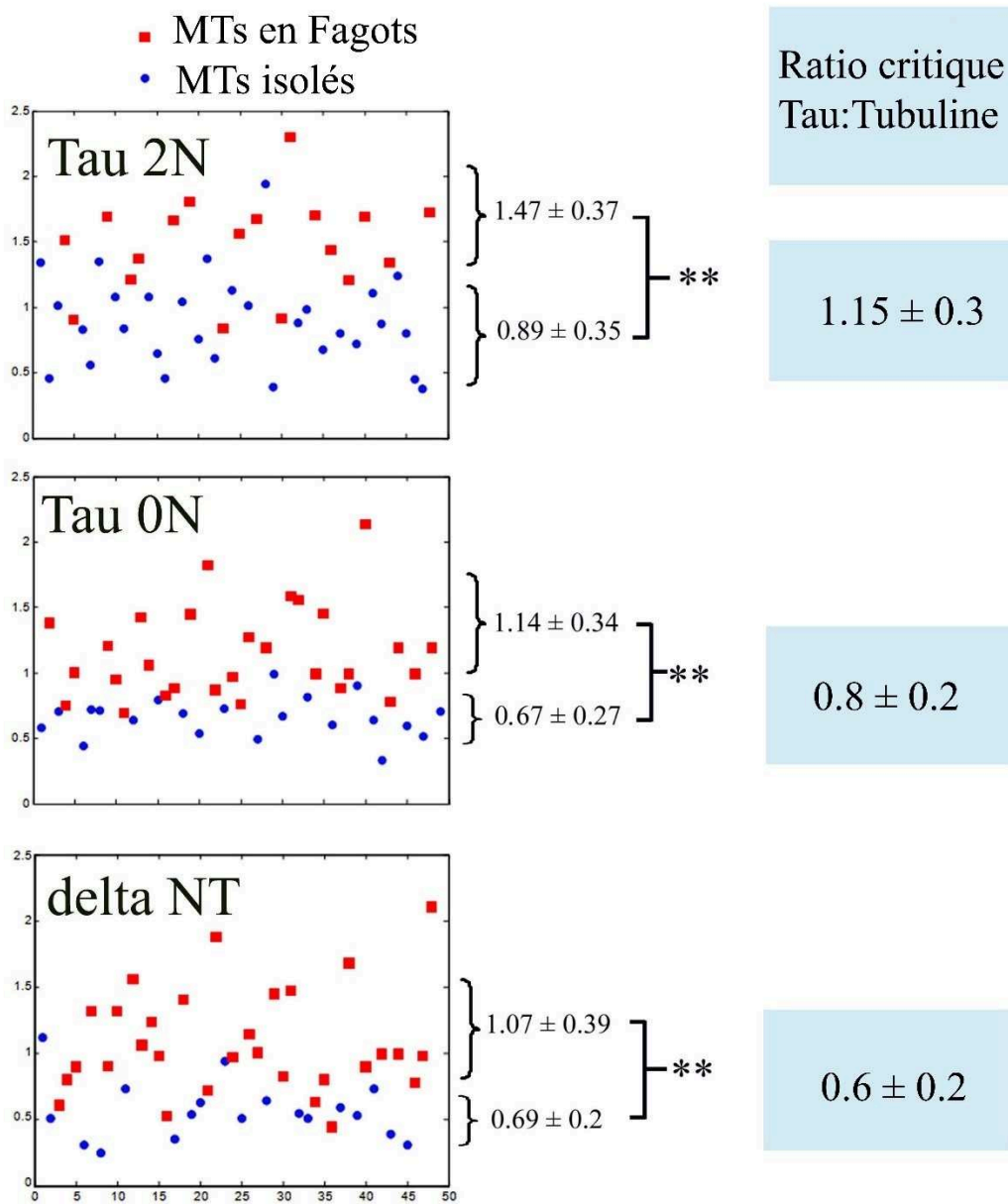


Figure III-25 : Analyses statistiques de la formation de fagots de microtubule dans 50 cellules HeLa à partir du ratio de fluorescence Tau:Tubuline pour les trois constructions de Tau. Pour toutes les constructions, le ratio de fluorescence critique est indiqué sur la figure avec son écart-type. Les statistiques ont été obtenues à partir d'un test de Student bilatéral ** $p < 0,01$.

Ces observations étant contraires aux données *in vitro*, nous avons voulu pousser l'étude en excluant l'influence de la stabilisation des MTs sur la mise en fagots. Pour ce faire, nous avons surexprimé Tau 2N et Tau DeltaNT dans des cellules HeLa traitées 8h avec 100 nM de taxol (Figure III-26). Nous avons choisi de traiter les cellules dans ces conditions car nous avons remarqué qu'un traitement court induisait le détachement de Tau des MTs, cependant exposer les cellules plus longtemps (≈ 8 h) permettait à Tau de revenir sur les MTs. Le détachement de Tau lors de courtes expositions au taxol peut être dû à une compétition Taxol/Tau²⁴²⁻²⁴⁴ ou à des modifications post-traductionnelles transitoires.

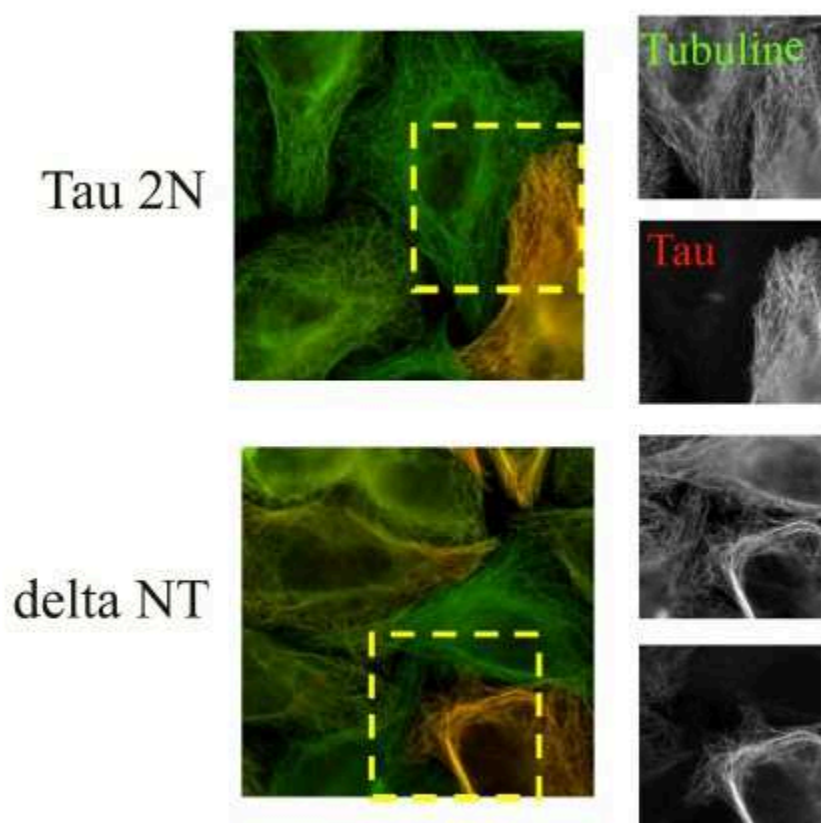


Figure III-26 : Images de microscopie à fluorescence de cellules HeLa exprimant Tau 2N et deltaNT. (Les anticorps anti-tubuline et anti-tau sont respectivement marqués en vert et rouge).

Après le traitement au taxol, les résultats obtenus sont similaires aux résultats obtenus sans taxol, cependant les différences entre les deux isoformes semblent significatives. Cette variation, nous permet de mettre en évidence la régulation négative du domaine de projection sur la génération des fagots. Nous notons également que la présence de taxol cause une diminution des ratios critiques de

40 % et 65 % pour Tau 2N et DeltaNT respectivement. Cela signifie que ce traitement rend les MTs plus prompts à former des fagots ce qui peut s'expliquer soit par un effet de la stabilisation des MTs, soit par une baisse de l'affinité de Tau due à une compétition Tau/Taxol ou à des modifications post-traductionnelles.

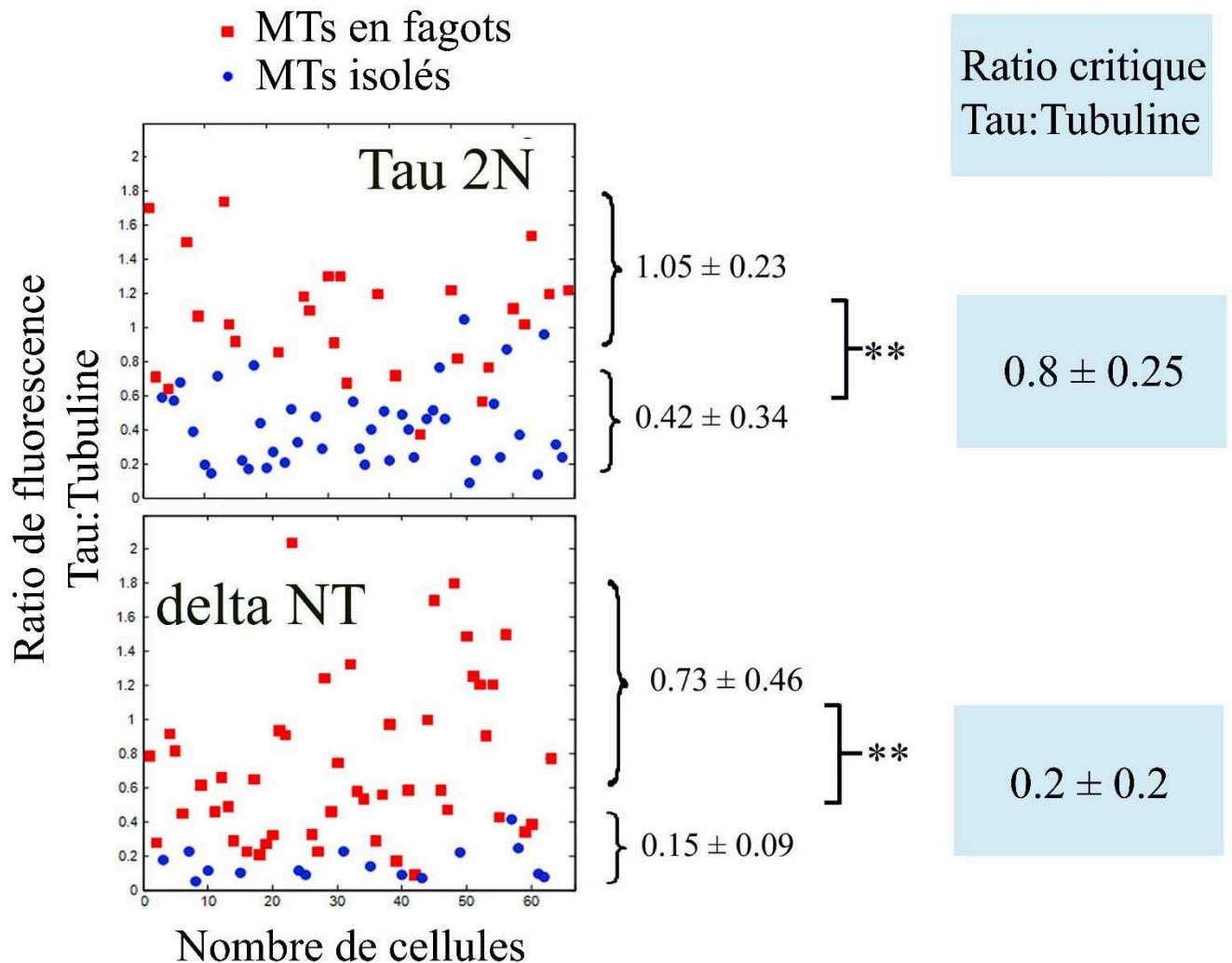


Figure III-27 : Analyses statistiques de la formation de fagots de microtubule dans 60 cellules HeLa traitées 8 h avec 100 nM taxol à partir du ratio de fluorescence Tau:Tubuline pour Tau 2N et deltaNT. Le ratio de fluorescence critique est indiqué sur la figure avec son écart-type. Les statistiques ont été obtenues à partir d'un test de Student bilatéral ** p < 0,01.

F. Conclusions de la 1ère partie

Dans cette première partie, les résultats obtenus *in vitro* montrent que Tau est capable d'induire la formation de fagots de MTs lorsqu'elle est exprimée au-delà d'un ratio critique Tau:Tubuline :

- Premièrement, nous avons mis en évidence une corrélation positive entre la formation de fagots de MTs et la longueur de la partie N-terminale de Tau. En effet, ce domaine paraît jouer un rôle critique dans la génération des forces attractives permettant aux MTs de former des fagots puisque DeltaNT a été incapable d'en induire.
- Puis, nous avons constaté que le rôle de Tau dans la mise en fagots des MTs était lié à des interactions électrostatiques car lorsqu'on augmente la force ionique, Tau est moins capable de former des fagots. Ce résultat concorde avec le modèle du « cross-bridge », cependant nous ne pouvons pas exclure que la réduction de l'affinité de Tau pour les MTs soit responsable de la diminution de l'attraction.

Enfin, dans les cellules, nous avons constaté qu'à une faible concentration, Tau pouvait avoir une action négative sur les fagots. En effet, nous avons rencontré des régimes d'attraction (avec [Tau] élevée) et des régimes sans fagots de MTs (avec [Tau] faible). Ces derniers s'avèrent être positivement corrélés à la longueur de la partie N-terminale de Tau. Cette dernière paraît avoir une influence négative sur la mise en fagot : plus le domaine de projection est long, plus il faut de Tau sur les MTs pour former des fagots.

Partie 2 : Rôle de l'encombrement macromoléculaire sur l'organisation des MTs

A. Introduction

Dans cette seconde partie, nous avons voulu examiner *in vitro* un modèle d'étude plus proche de ce qui se passe dans la cellule. Nous nous sommes spécialement intéressés aux effets des interactions de volume exclu engendrées par l'encombrement macromoléculaire sur les MTs. Puis, nous nous sommes penchés sur le rôle que tenait Tau, et en particulier son domaine N-terminal, dans un tel environnement. Pour ce faire, nous avons utilisé de la turbidimétrie, de l'AFM, et de la microscopie électronique. Enfin, nous avons voulu déterminer si les résultats obtenus *in vitro* pourraient refléter ce qui se déroule *in vivo* en estimant le ratio molaire Tau:Tubuline à l'aide de neurones corticaux primaires de souris co-cultivées avec des cellules HeLa exprimant Tau 2N.

B. Rôle de l'encombrement macromoléculaire sur la mise en fagots des MTs

Lorsque l'on étudie l'assemblage de 15 μM de tubuline en ajoutant un gradient de concentration de PEG 35K au départ de la polymérisation, on constate que la valeur du plateau augmente en même temps que la concentration en PEG 35K (Figure III-28). Pour rappel, ce phénomène peut résulter de trois événements indépendants :

- L'augmentation de la masse finale de tubuline polymérisée,
- L'agrégation de tubuline libre,
- La mise en fagot des microtubules.

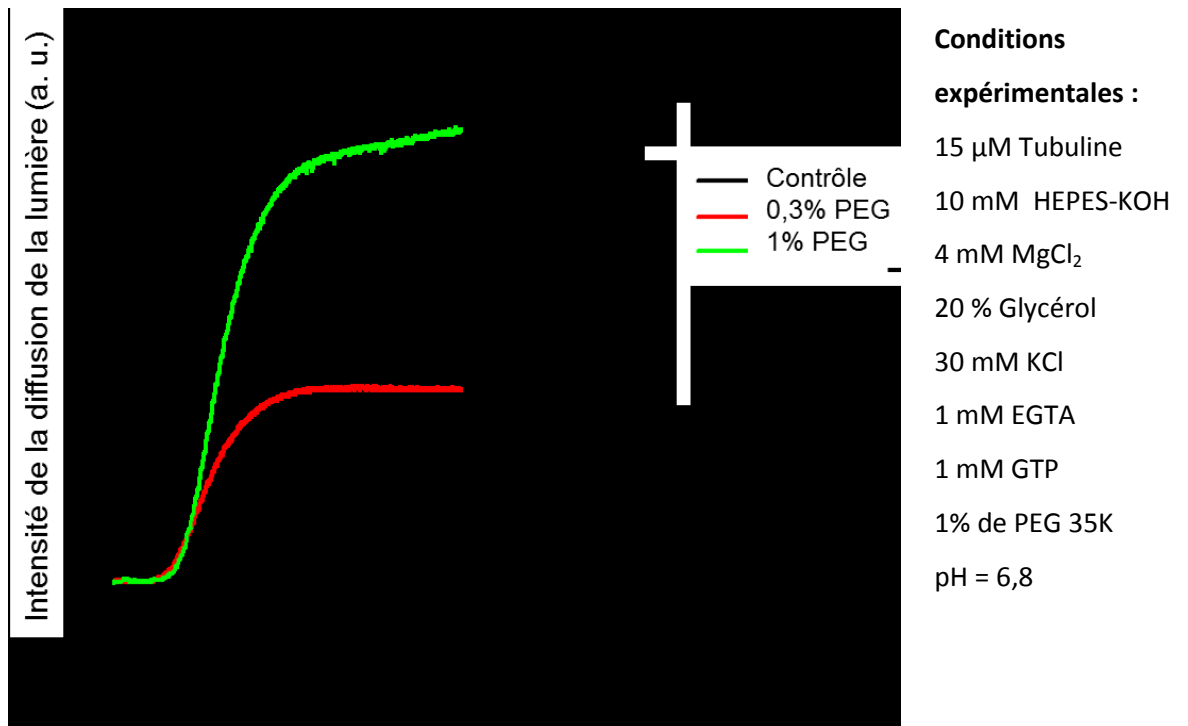


Figure III-28 : Assemblage de 15 μ M de Tubuline suivi par turbidimétrie en fonction du pourcentage de PEGK 35K.

Ainsi, afin de vérifier si des fagots de MTs étaient formés, nous avons étudié l'effet de 1 % de PEG 35K ajouté au départ de la polymérisation par AFM. Sur la Figure III-29, on constate que l'augmentation du plateau est due (au moins en partie) à la mise en fagot des MTs.

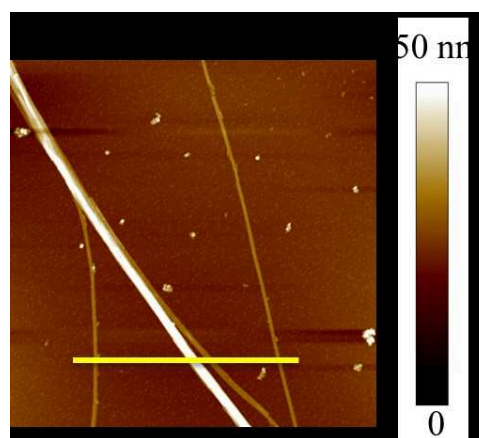


Figure III-29 : Image AFM de MTs polymérisés en présence de 1% de PEG 35K

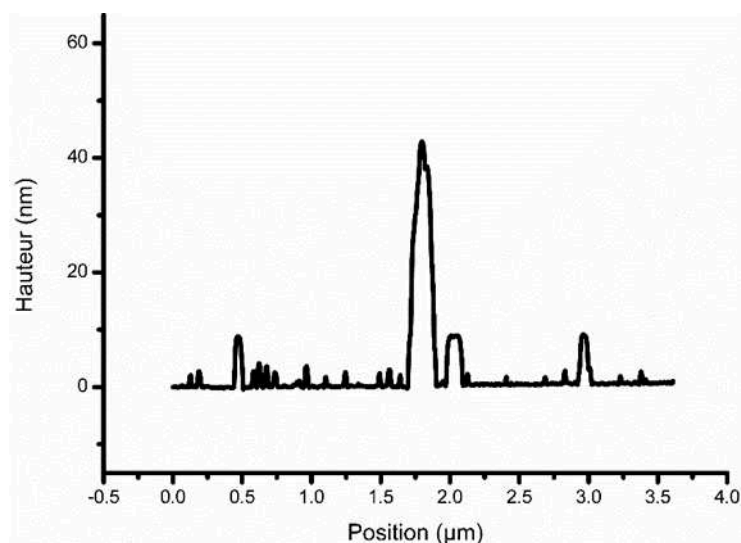


Figure III-30 : Profil d'intensité associé à la Figure III-28

C. Tau inhibe la mise en « fagot serrés » des MTs dans un environnement encombré via son domaine N-terminal *in vitro*

En premier lieu, nous avons tenté de mieux appréhender l'effet de Tau sur la dynamique des MTs dans des conditions d'encombrement macromoléculaire *in vitro*, c'est à dire en présence de PEG 35K. Ainsi, nous avons polymérisé 15 μ M de tubuline auxquels nous avons appliqué un gradient de Tau sous ses différents isoformes en présence de 1 % de PEG 35K.

Nous avons ensuite renouvelé nos expériences en utilisant du taxol, ce qui nous a permis d'éliminer les effets dus à la dynamique des MTs et la présence de tubuline libre. Nous observons donc uniquement les variations de l'intensité de la diffusion de la lumière dues à l'augmentation de la taille des objets présents dans le tampon de polymérisation.

Sur les Figures III-32 à III-35, le point $t=0$ représente des MTs polymérisés puis stabilisés à l'aide 5 μ M de taxol une fois le plateau atteint. Nous leur avons ensuite appliqués un gradient de Tau sous ses

différents isoformes. Puis, nous avons attendu 15 min avant de rajouter 1 % de PEG 35K pour laisser le temps aux fagots de Tau d'être formés tel qu'expliqué fFigure III-31.

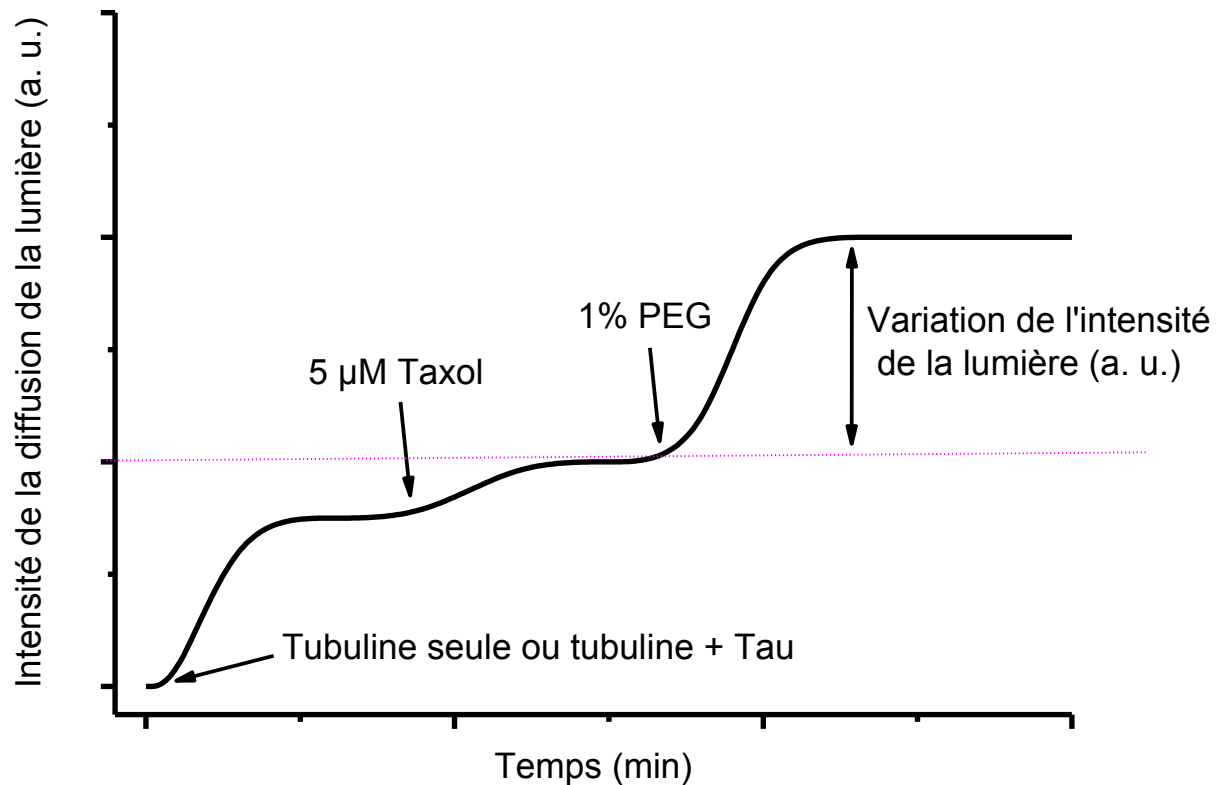
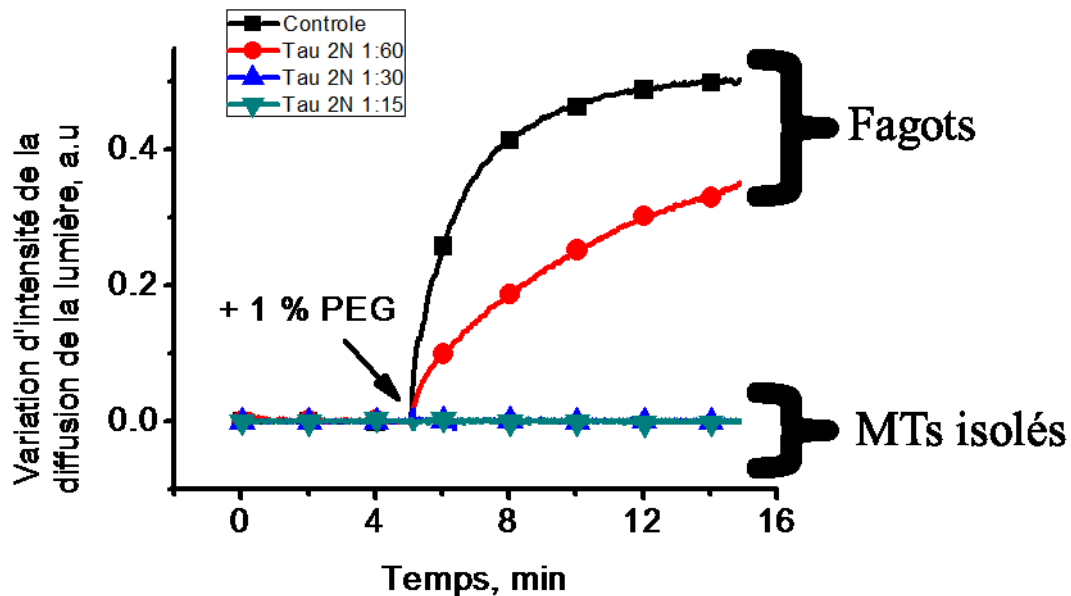


Figure III-31 : Variation de l'intensité de la diffusion de la lumière de MT-Tau stabilisés avec 5 µM de taxol auxquels sont ajoutés 1 % PEG.

Sur les Figures III-32 et III-34, lorsque Tau est absent (contrôle), on observe que l'ajout de PEG 35K induit une augmentation de la diffusion de la lumière qui traduit une mise en fagot des MTs. Puis, que pour des concentrations croissantes de Tau, la variation du signal tend à s'atténuer après l'ajout du PEG 35K. Nous traduisons ce phénomène par une régulation négative de la mise en fagot des MTs due à la présence de Tau dans le tampon de polymérisation.

De plus, Tau 2N paraît être un inhibiteur plus efficace que Tau 0N puisque :

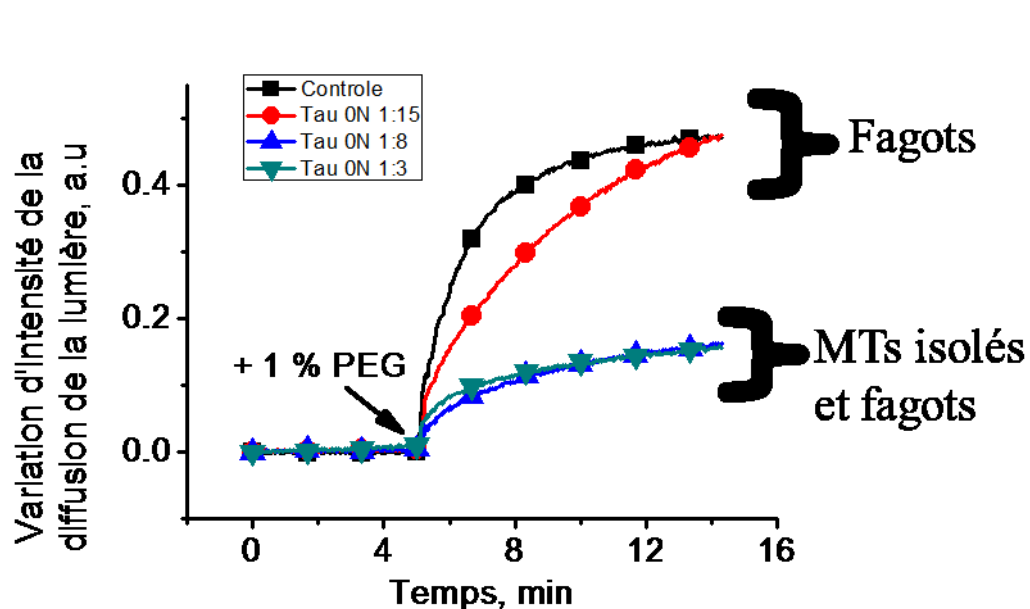
- Il agit pour un ratio Tau:Tubuline inférieur à celui de Tau 0N.
- L'inhibition est totale pour Tau 2N, mais partielle pour Tau 0N même à des concentrations élevées.



Conditions expérimentales :

- 15 μ M Tubuline
- 10 mM HEPES-KOH
- 4 mM $MgCl_2$
- 20 % Glycérol
- 30 mM KCl
- 1 mM EGTA
- 1 mM GTP
- 5 μ M Taxol
- 1 % de PEG 35K
- pH = 6,8

Figure III-32 : Inhibition de la mise en fagot des MTs en présence de PEG 35K et de Tau 2N observée par turbidimétrie sur des MTs préalablement stabilisés avec 5 μ M de taxol.



Conditions expérimentales :

- 30 μ M Tubuline
- 10 mM HEPES-KOH
- 4 mM $MgCl_2$
- 20 % Glycérol
- 30 mM KCl
- 1 mM EGTA
- 1 mM GTP
- 5 μ M Taxol
- 1 % de PEG 35K
- pH = 6,8

Figure III-33 : Inhibition de la mise en fagot des MTs en présence de PEG 35K et de Tau 0N observée par turbidimétrie préalablement stabilisés avec 5 μ M de taxol.

Enfin, comme on peut le constater sur la Figure III-34, nous n'avons observé aucune inhibition de l'effet de PEGK 35K sur la mise en fagots de MTs en présence de DeltaNT.

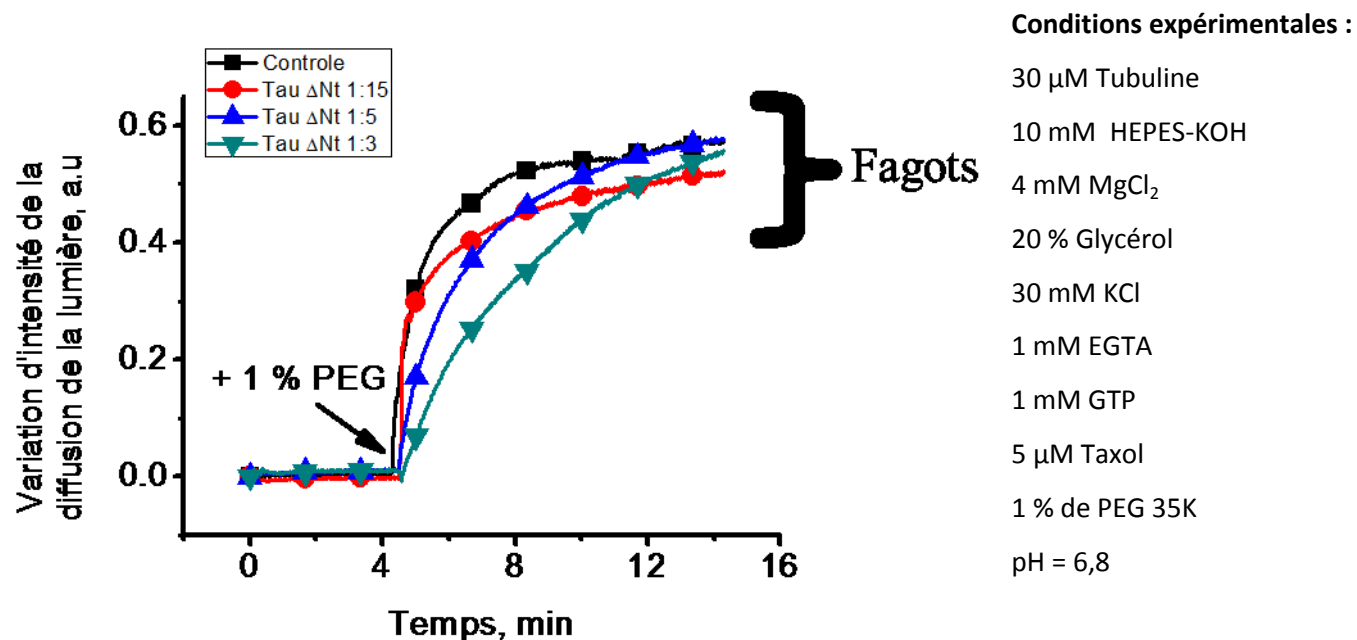


Figure III-34 : Absence d'inhibition de la mise en fagot des MTs en présence de PEG 35K et de Tau deltaNT observée par turbidimétrie préalablement stabilisés avec 5 μ M de taxol.

Nous avons ensuite vérifié grâce à la microscopie AFM l'organisation des MTs à un ratio molaire Tau:Tubuline de 1:15 (Figure III-35). On constate que dans nos conditions contrôles (i.e. sans Tau), l'ajout de 1 % de PEG 35K génère la formation de fagots serrés. En effet, la hauteur des MTs est multipliée par 4 en condition d'encombrement macromoléculaire par rapport au contrôle (Figure III-36). De plus, lorsque Tau 2N (ou Tau 0N) est ajoutée avant le PEG 35K, les MTs sont alignés suivant la même orientation bien qu'ils aient la même hauteur que le contrôle. En revanche, lorsque c'est DeltaNT qui est ajoutée, les MTs sont organisés comme le contrôle avec PEG 35K.

Ces résultats sont en accord avec les expériences de diffusion et nous permettent de conclure que la partie N-terminale de Tau joue bien un rôle d'inhibition sur la mise en fagot serrés des MTs dans nos conditions expérimentales (Figure III-37). En effet, Tau 2N ou Tau 0N ont la capacité de favoriser la formation de fagots « lâches » où tous les MTs sont orientés dans la même direction mais sans être tassés les uns sur les autres.

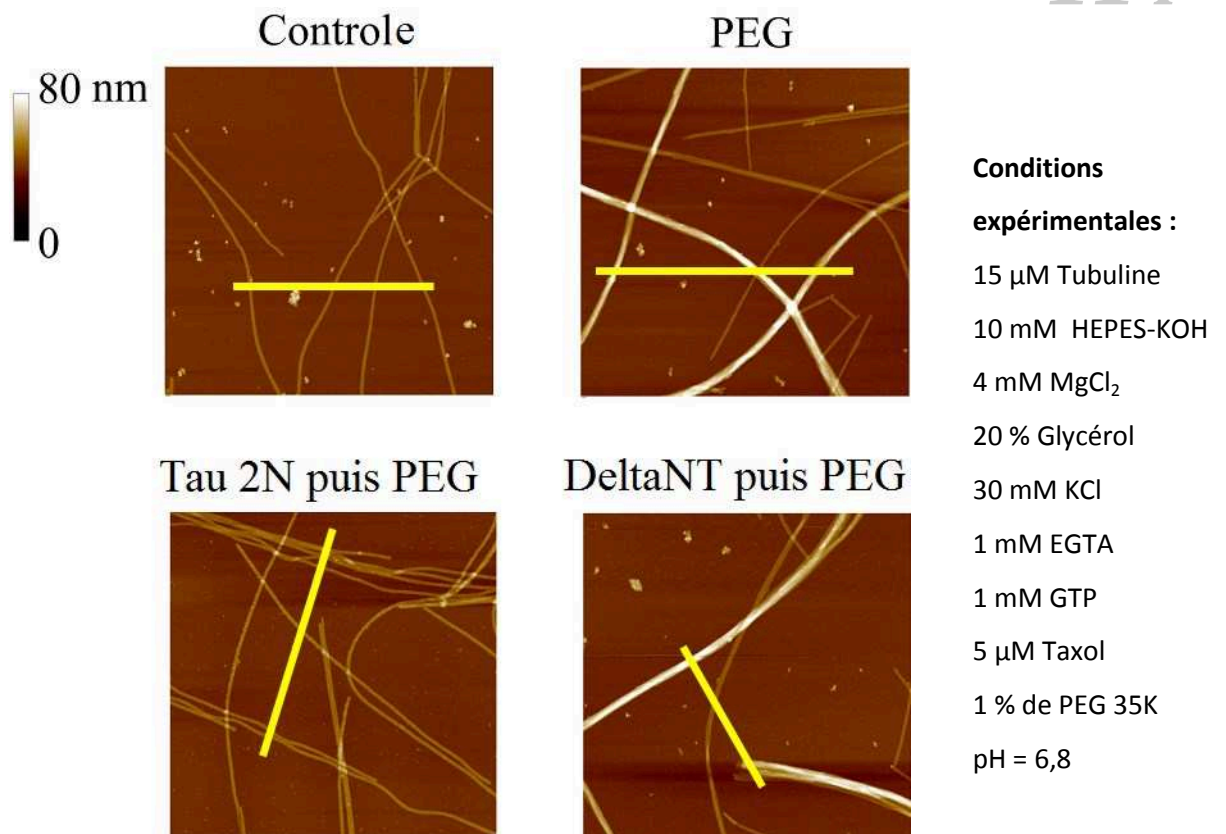


Figure III-35 : Contrôle des résultats obtenus par turbidimétrie sur l'inhibition de la mise en fagot des MTs par la partie N-terminale de Tau en présence de 1 % PEG 35K, de Tau 2N et de DeltaNT à un ratio molaire de 1:15. Images AFM réalisées à partir de MTs préalablement stabilisés avec 5 μM de taxol. (5 μm^2).

Ce phénomène n'est pas réversible puisque lorsque PEG 35K est mis avant Tau, les MTs ne sont plus séparés et retrouvent la même hauteur que le contrôle avec 1 % de PEG (Figure III-37). Les MTs sont en fagots serrés. L'agrégation irréversible des MTs implique que lorsque les MTs sont organisés en fagots serrés, ils ne sont plus accessibles pour les protéines Tau. Ce test a été réalisé à une concentration de Tau faible, mais nous avons pu valider par turbidimétrie que la concentration de Tau n'avait aucun effet sur la réversibilité du processus (donnée non présentée).

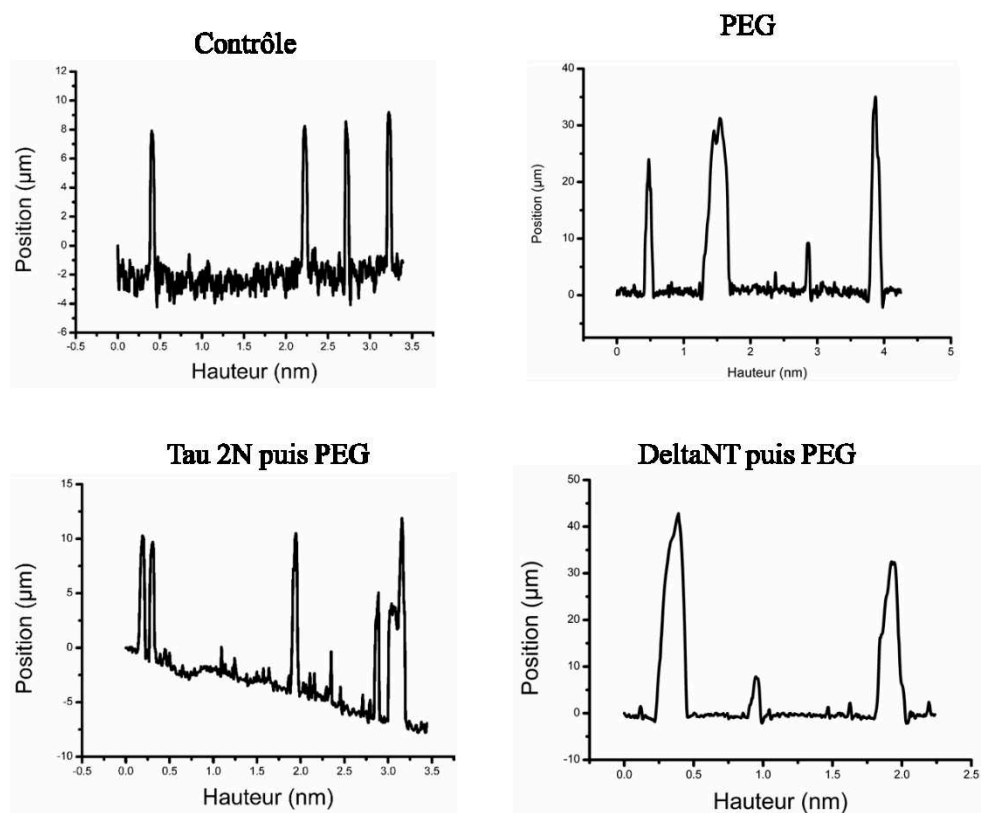


Figure III-36 : Profil des hauteurs des MTs situés le long de la ligne jaune représentée sur la fFigure III-35.

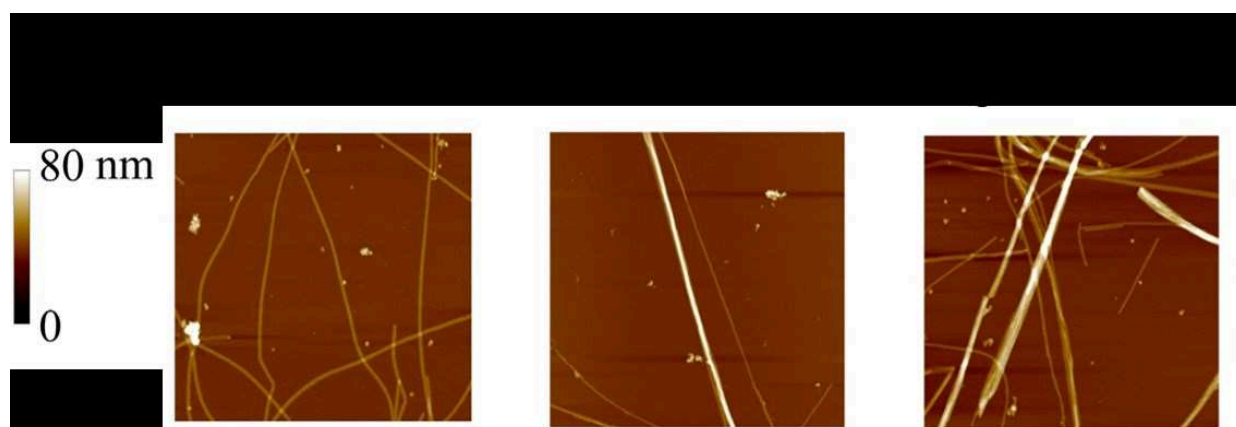


Figure III-37 : Non réversibilité de la mise en fagots serrés des MTs en présence de PEG 35K lorsque Tau 2N est ajouté à un ratio molaire de 1:15 après 1 % de PEG 35K. Images AFM obtenues à partir de MTs préalablement stabilisés avec 5 μM de taxol dans les mêmes conditions expérimentales que la Figure III-35. (5 μm^2)

Afin de vérifier ces observations, nous avons déterminé par microscopie électronique la distance de séparation entre les MTs en condition d'encombrement macromoléculaire en présence de Tau 2N et de Tau DeltaNT. Les échantillons ont été polymérisés à 37°C avec un ratio molaire Tau:Tubuline de 1:8. Après avoir atteint l'état stationnaire, 5 µM de taxol ont été ajoutés. Les échantillons ont ensuite été incubés 15 min avec 1 % de PEG 35K.

Sur la Figure III-38, sur le contrôle MTs seuls, on constate que les MTs sont isolés. En présence de 1 % PEG 35K, on constate que les MTs sont en fagots « serrés ». Puis, lorsque l'on ajoute de Tau 2N avant le PEG, on constate que les MTs semblent plus espacés, on retrouve à la fois des MTs isolés et des MTs en fagots. A contrario, lorsque c'est la forme tronquée qui est ajoutée, nous ne voyons que des « MTs en fagots serrés ».

Nous avons alors voulu quantifier ce phénomène en mesurant les distances centre à centre entre les MTs dans les fagots. Ainsi, sur la Figure III-39, la distance de séparation des MTs dans un fagot est :

- D'environ 30 nm pour le contrôle 1 % PEG 35K,
- D'environ 40 nm lorsque Tau 2N est ajoutée avant le PEG 35K
- Et, d'environ 25 nm lorsque Tau DeltaNT est ajoutée avant le PEG 35K. Nous attribuons le fait que la distance de séparation interMT de Tau deltaNT soit inférieure à celle du contrôle à sa charge positive supérieure. En effet, elle peut réduire la répulsion électrostatique entre les queues C-terminales très négativement chargées de la tubuline qui sont exposées à l'extérieur du MT.

Les observations faites par microscopie électronique concordent avec les résultats obtenus par AFM et par turbidimétrie, et permettent de conclure que la partie N-terminale permet effectivement de garder à distance les MTs. En effet, l'ultrastructure des fagots est différente dans un environnement encombré où, en présence du domaine de projection de Tau 2N nous observons des « fagots lâches » significativement différents des « fagots serrés » que l'on rencontre en son absence.

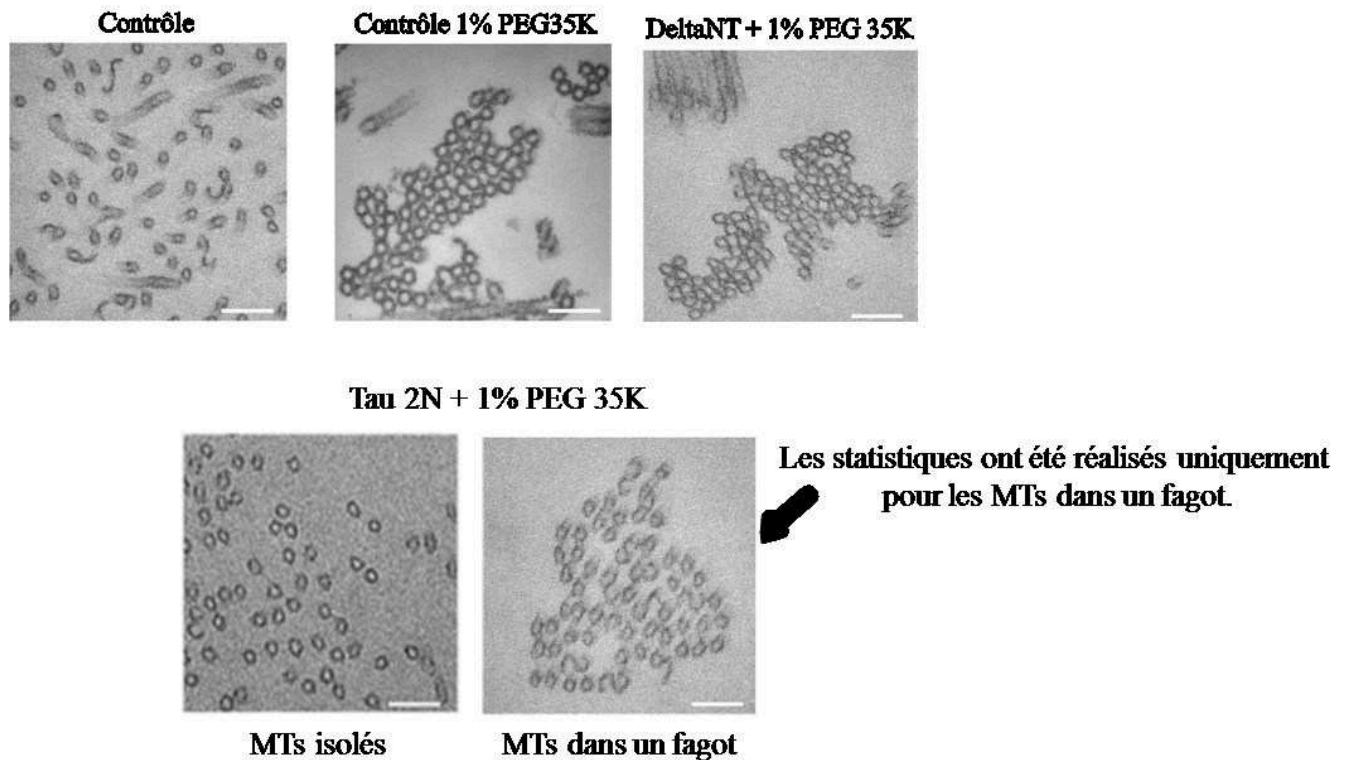


Figure III-38 : Images de microscopie électronique de MTs polymérisés en présence de Tau à un ratio molaire Tau:Tubuline de 1:8 puis stabilisés à l'équilibre avec 5 μ M de taxol. Par la suite, les MTs ont été exposés 15 min à 1 % de PEG 35K (barre d'échelle = 100 nm).

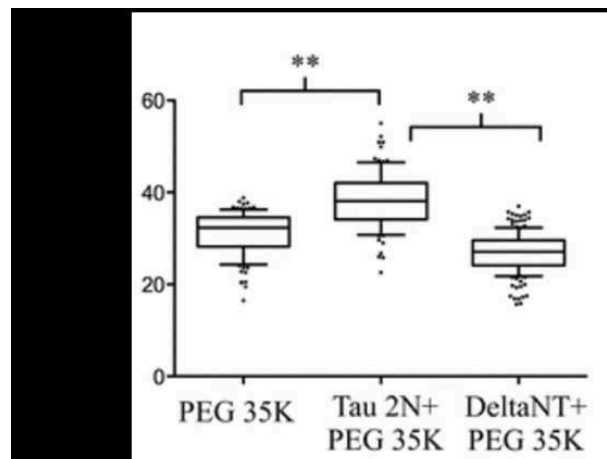
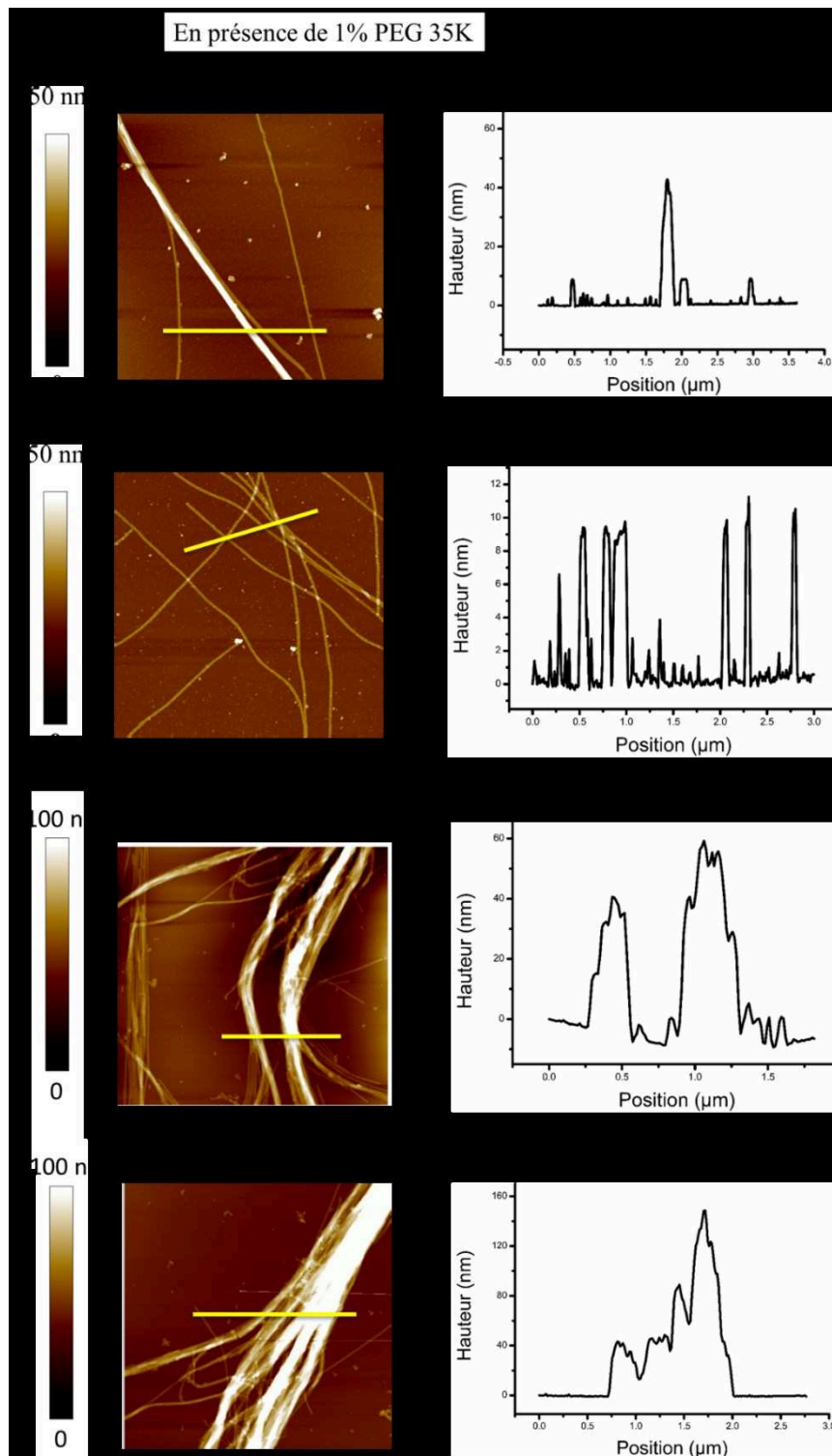


Figure III-39 : Mesure statistique de la distance centre à centre des MTs en fagot obtenue à partir de la Figure III-38. Les résultats représentent la moyenne et l'écart-type sur un échantillon $n > 95$. Les statistiques proviennent d'un test de Student bilatéral (** $< 0,01$).

Dès lors, nous avons entrepris de polymériser de la tubuline en présence d'un gradient de concentration de Tau 2N afin de déterminer si la structure des fagots était différente. Une fois les MTs arrivés à l'état stationnaire, nous les avons stabilisés avec 5 μM de taxol puis nous avons ajouté 1 % de PEG 35K. Les échantillons ont ensuite été déposés sur du mica afin d'être observés par AFM.

Sur la Figure III-40, on observe que lorsque l'on effectue un gradient de concentration de Tau dans un environnement encombré, les structures obtenues ont un aspect similaire à celles vues en l'absence de 1 % PEG 35K. Ainsi, on constate que Tau arrive à contrer l'effet de l'encombrement macromoléculaire. En effet, à faible concentration on constate que les MTs sont isolés. Par ailleurs, lorsque la concentration de Tau est plus importante bien que les objets présents sur la surface soient hauts, les MTs demeurent espacés.

**Conditions****expérimentales :**

- 10 μ M Tubuline
- 10 mM HEPES-KOH
- 4 mM $MgCl_2$
- 20 % Glycérol
- 30 mM KCl
- 1 mM EGTA
- 1 mM GTP
- 5 μ M Taxol
- 1 % de PEG 35K
- pH = 6,8

Figure III-40 : (*gauche*) Images AFM de MTs polymérisés en présence d'un gradient de [Tau] puis stabilisés à l'équilibre avec 5 μ M de taxol. Par la suite, les échantillons ont été incubés 15 min à 1 % de PEG 35K (barre d'échelle = 100 nm). (*droite*) Profils de fluorescence associés (calculés le long de la ligne jaune).

D. Estimation de la concentration de Tau dans les axones

La microscopie électronique nous a permis d'établir que l'espacement des MTs avait la distance d'un cross-bridge (20 nm) en présence de Tau 2N (fFigure III-39). Ce résultat nous a permis de comparer l'architecture des fagots formés dans un environnement encombré selon la présence de Tau 2N et DeltaNT :

- Lorsque la protéine Tau 2N est absente, les fagots formés peuvent être qualifiés de « fagots serrés » puisque la distance inter-MT est faible (fFigure III-38).
- En revanche, avec Tau 2N, nous avons constaté que les objets formés étaient des « fagots lâches » : en présence de PEG, les fagots de Tau ont une distance inter-MT supérieure de 25 % au contrôle (Figure III-40).
- Par ailleurs, dans nos conditions expérimentales, il apparaît que l'isoforme DeltaNT soit incapable d'inhiber la formation de fagots serrés. Compte tenu du fait que Tau ON semble moins efficace que Tau 2N pour inhiber la formation de fagots serrés, il pourrait y avoir une corrélation positive entre la longueur du domaine N-terminal et cette inhibition (fFigure III-32 à 34 et III-39).

A première vue donc, nos résultats valident l'hypothèse selon laquelle Tau espace les MTs. Nous nous sommes donc demandés si le modèle du *polymer brush* de Mukhopadhyay et al^{173,174} pourrait prévaloir dans les axones. Ce paradigme étant lié à la concentration axonale de Tau, nous avons entrepris d'y estimer le ratio molaire Tau : Tubuline. En effet, le modèle du « *polymer brush* » ne fonctionne que si Tau peut former une couche répulsive continue sur les MTs. Or, dans la littérature, très peu d'informations sont disponibles sur le ratio Tau : Tubuline axonal.

Afin d'approfondir ce point, nous avons pris l'initiative de réaliser un système d'étude composé de neurones corticaux primaires de souris cultivés pendant 7 jours puis co-cultivés avec des cellules HeLa où Tau 2N est surexprimée (fFigure III-41).

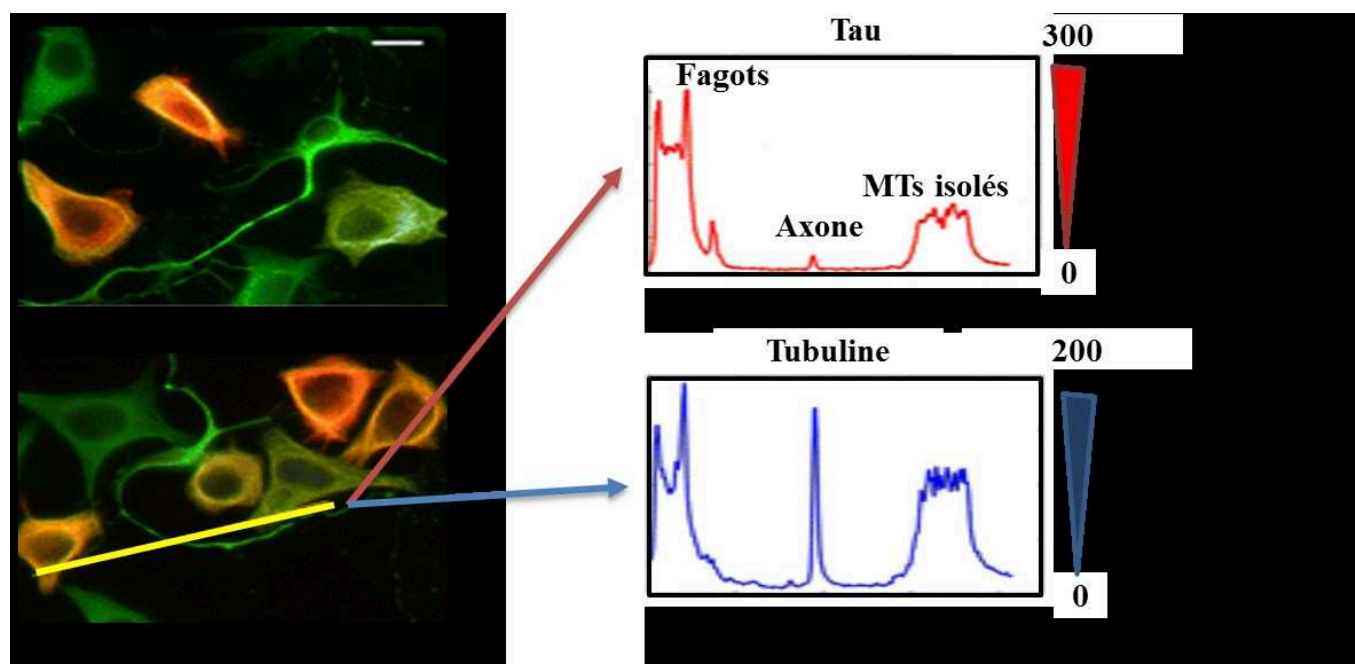


Figure III-41 : (*Droite*) Neurones corticaux primaires de souris cultivés pendant 7 jours, puis co-cultivés avec des cellules HeLa exprimant Tau 2N pendant 8 h. Les anticorps anti-Tau et anticorps anti-Tubuline sont représentés respectivement en rouge et en vert. La barre d'échelle représente 30 μm . (*Gauche*) Intensités de fluorescence de Tau et de la tubuline le long du trait jaune représentée pour Tau en rouge et pour la tubuline en bleu.

L'avantage de cette technique est qu'elle nous permet de comparer les niveaux de fluorescence (soit l'expression) de la protéine Tau dans les neurones et les cellules HeLa nous servant de contrôles internes (cf. matériel et méthodes).

Afin de reconnaître à la fois la forme humaine surexprimée et la forme murine présente dans les axones, nous avons choisi un anticorps anti-Tau qui cible un épitope localisé dans l'extrémité C-terminale de la protéine conservée chez l'homme et chez la souris.

Grâce aux profils d'intensité de Tau et de la Tubuline nous avons constaté que le ratio critique de fluorescence Tau:Tubuline (cf Figure III-24) était égal à 1,72 dans les cellules HeLa surexprimées (Figure III-42). En ce qui concerne les axones, nous avons calculé la moyenne de l'intensité de fluorescence sur 60 cellules. Nous avons ainsi obtenu un ratio de fluorescence moyen de 0,25 représentatif de la concentration physiologique de Tau soit environ 7 fois moins que lorsque la protéine Tau est surexprimée.

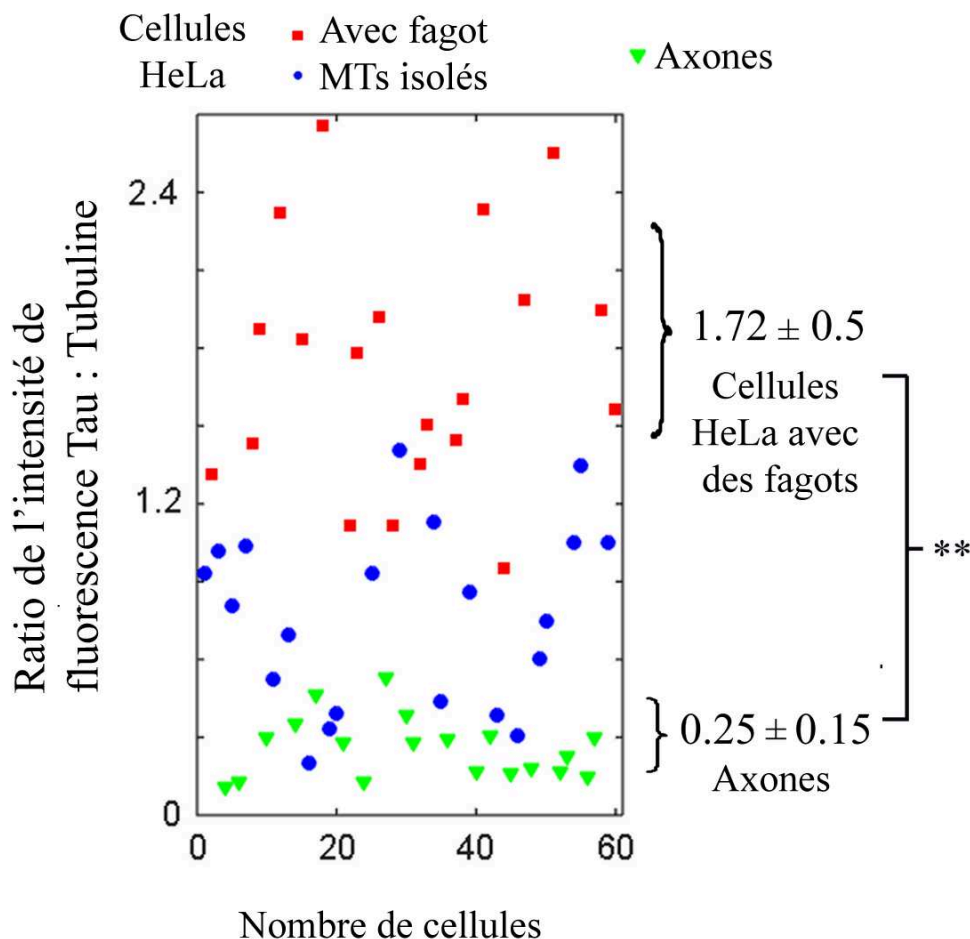


Figure III-42 : Analyse statistique des ratios de fluorescence Tau:Tubuline mesurés dans les cellules HeLa (cercles bleus et carrés rouges selon que les MTs sont en isolés ou en fagots) réalisée sur 60 cellules. Les triangles verts représentent l'intensité de la fluorescence des axones à différentes positions. Est également indiqué la moyenne et l'écart type. Les statistiques ont été obtenues à partir d'un test de Student bilatéral ** $p < 0,01$.

Bien qu'il ne soit pas forcément représentatif du régime des MTs axonaux (MTs isolés, fagots serrés, fagots lâches), ce comparatif nous permet de constater que la concentration de Tau dans les axones pourrait être beaucoup plus faible que celle dans les cellules HeLa où Tau a été surexprimée et pour laquelle les fagots sont observés. En effet si on classe les cellules par ordre de ratio de fluorescence on constate que le ratio Tau:Tubuline axonal est très en dessous de ce qu'il faut dans les cellules HeLa pour former des fagots (Figure III-43).

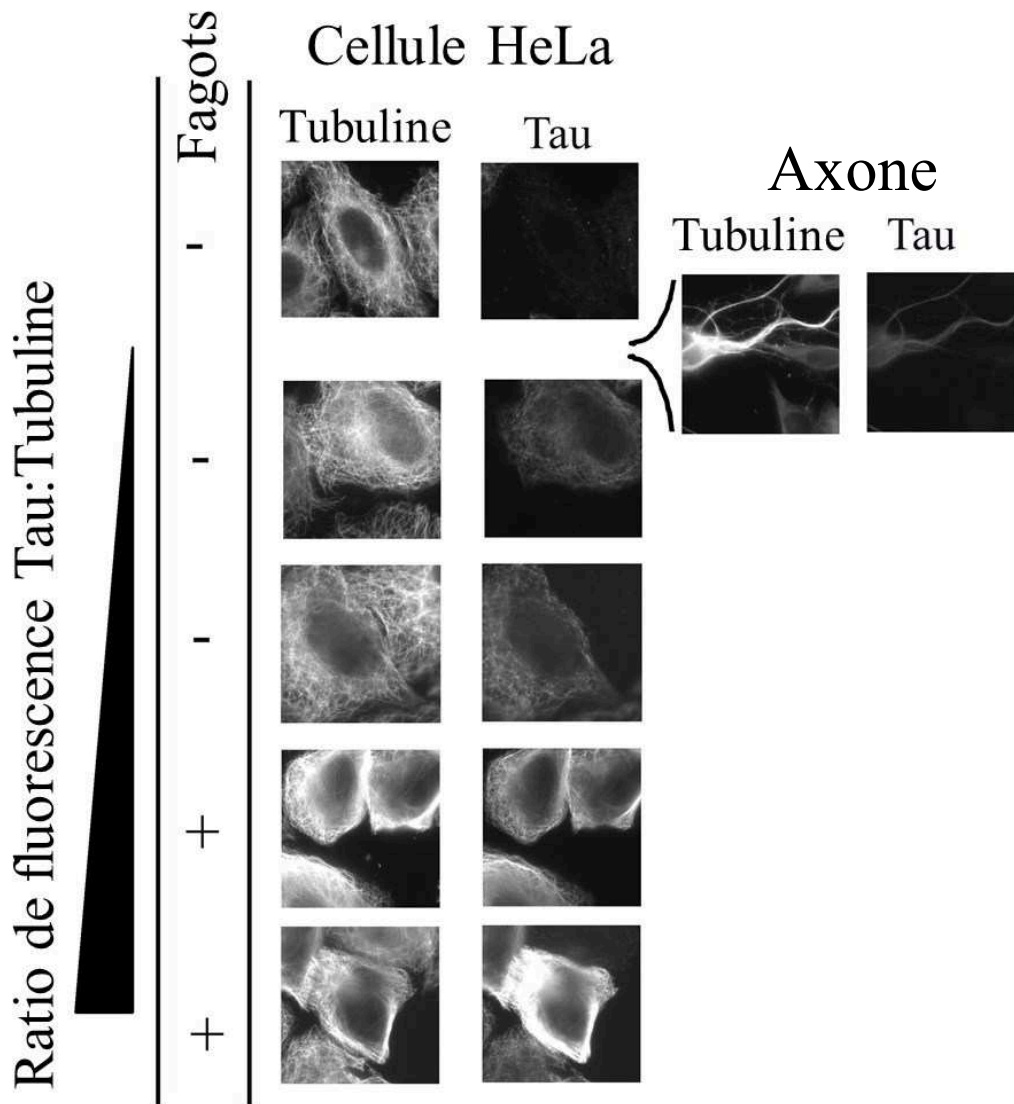


Figure III-43 : Images de cellules HeLa classées par ordre croissant de ratio de fluorescence Tau:Tubuline et d'un axone représentatif.

L'hypothèse selon laquelle Tau favorise la mise en fagot des MTs dans les axones est basée sur des cellules où Tau 2N a été surexprimées. Or, d'après nos expériences, suite à une surexpression, la concentration de Tau dans les cellules HeLa semble supérieure à la concentration physiologique de Tau dans les axones. Ceci nous apparaît comme un argument contre ce rôle putatif.

Ainsi, afin de faire un parallèle entre les résultats obtenus *in vitro* avec ceux obtenus dans les cellules, nous avons déposé des Mts avec des ratios Tau : Tubuline connus sur du mica ce qui nous a permis de réaliser une courbe d'étalonnage du ratio d'intensité de fluorescence en fonction du ratio molaire Tau:Tubuline (Figure III-44).

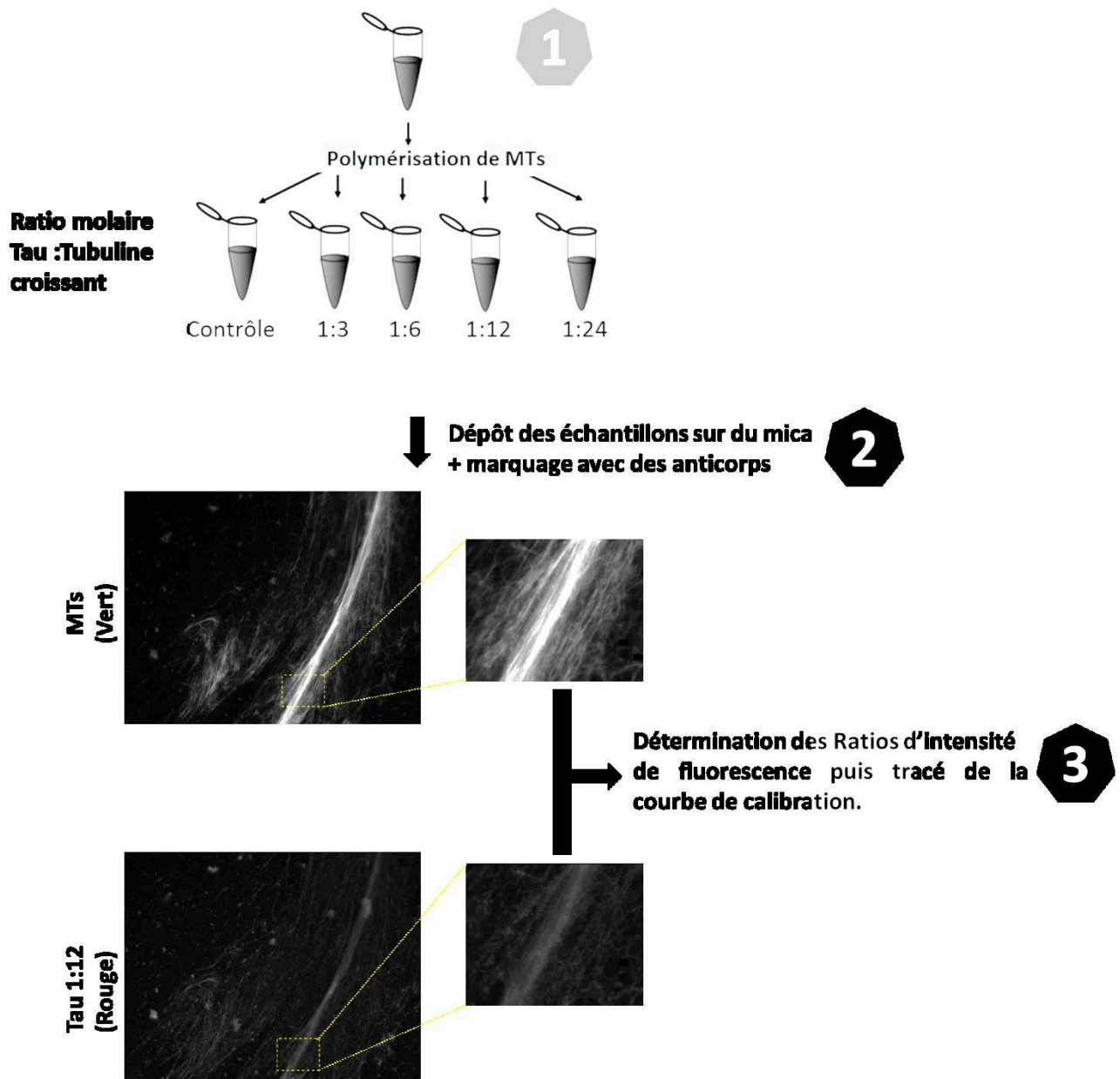


Figure III-44 : Méthode d'obtention de la courbe de calibration du ratio de fluorescence Tau:Tubuline en fonction du ratio molaire Tau:Tubuline.

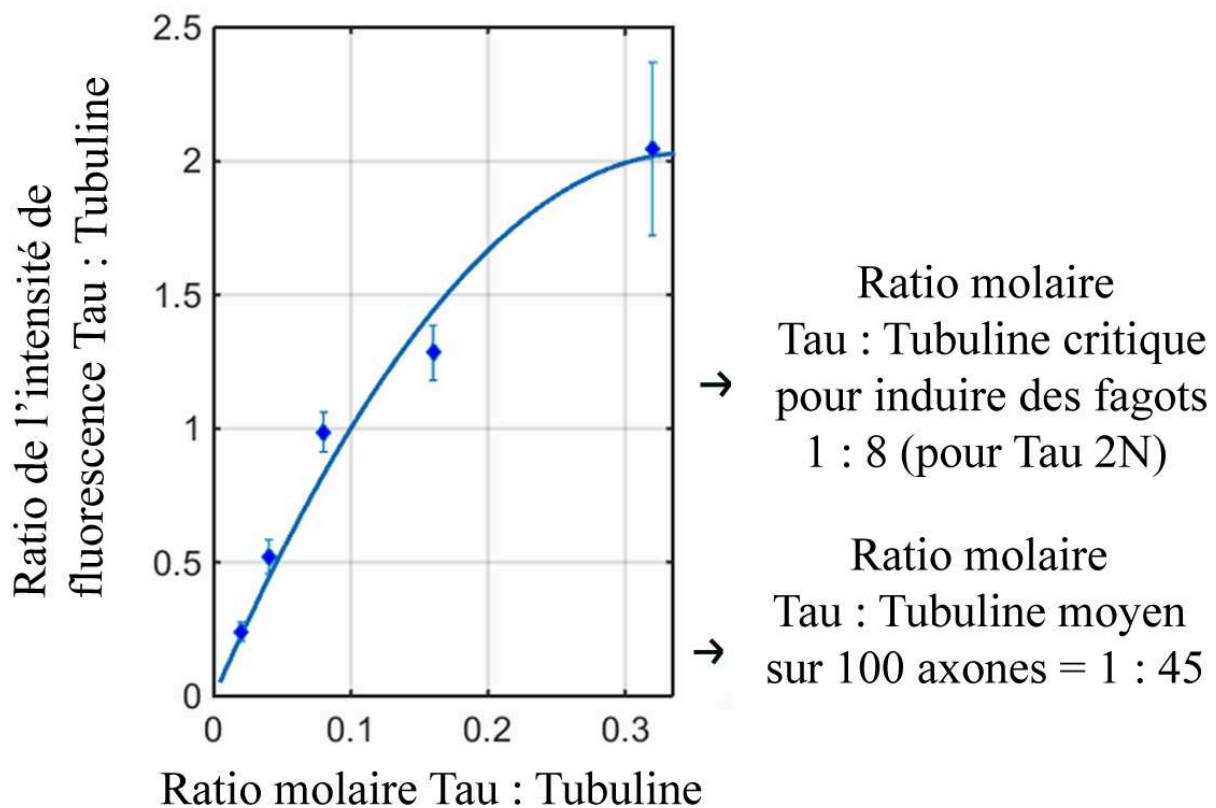


Figure III-45 : Courbe d'étalonnage du ratio de fluorescence Tau:Tubuline en fonction du ratio molaire Tau:Tubuline mesurée in vitro sur des MTs en interaction avec la protéine recombinante Tau 2N. Chaque point représente la moyenne sur dix mesures différentes.

En reportant la valeur moyenne du ratio de fluorescence Tau:Tubuline obtenue avec 100 axones (=0,17) sur la courbe de la Figure III-45, on obtient un ratio molaire Tau:Tubuline estimé à environ 0,02 soit environ 1 Tau pour 45 dimères de Tubulines ce qui est conforme avec les valeurs précédemment rapportées dans la littérature^{178-181,245}. En comparaison, pour déclencher une mise en fagot des MTs dans les cellules HeLa, le ratio molaire Tau:Tubuline doit être supérieur à 1:8 pour la protéine Tau 2N.

E. Conclusions de la 2^e partie

Dans cette seconde partie, nous avons pu constater que Tau avait un rôle biphasique sur la mise en fagot :

- *In vitro* :
 - On constate des fagots en présence de Tau à un ratio molaire Tau:Tubuline supérieur à 1:15. A contrario, en dessous de ce ratio molaire critique les MTs sont isolés malgré l'encombrement macromoléculaire.
 - Par ailleurs, lorsque ce ratio molaire critique est atteint, la présence de Tau induit des fagots avec une structure différente puisqu'ils sont plus espacés. Ainsi, au sein d'un fagot, l'espace inter-MT est supérieur de 25 % par rapport au contrôle PEG seul.
 - En outre, nous constatons que cette régulation négative est dépendante de la longueur du domaine de projection puisque DeltaNT est inactif, et que Tau ON est moins efficace que Tau 2N.
- Dans les cellules HeLa :
 - On note que le ratio molaire critique pour former des fagots est 1:8. Comme *in vitro*, en dessous de ce ratio les MTs sont isolés. Tau semble donc être un facteur antagoniste de la mise en fagot *in cellulo*.
- Dans les axones :
 - Selon notre estimation, la concentration axonale de Tau paraît insuffisante pour induire des fagots. Il semble donc que le rôle de Tau dans l'organisation axonale soit de garder les MTs séparés. Toutefois, bien que ces résultats soient en accord avec la régulation négative de fagots serrés décrite dans la littérature, la concentration de Tau semble trop faible pour qu'un mécanisme de « polymer brush » y ait lieu. Néanmoins, des précautions doivent être prises avant de généraliser ces résultats. En effet, le modèle d'étude choisi n'est pas représentatif de tous les neurones. En outre, le ratio molaire Tau:Tubuline n'est pas stable le long des axones et peut augmenter dans la région apicale²⁴⁶. Nous ne pouvons donc pas exclure que Tau puisse initier la mise en fagot des MTs localement dans l'axone.

Partie 3 : Stabilisation des MTs par Tau et intermédiaires de dépolymérisation (résultats préliminaires)

A. Introduction

Dans la partie 2, nous avons pu montrer que la protéine Tau pourrait jouer un rôle critique dans l'organisation des MTs. En effet, nous avons constaté qu'elle permettait d'espacer les MTs, *in vitro* et dans des cellules non neuronales, notamment dans des conditions favorables à leur regroupement telles que l'encombrement macromoléculaire.

Ce dernier n'est pas le seul paramètre pouvant générer la formation de fagots *in vitro*. Lorsque de la tubuline est polymérisée en présence de cations multivalents telles que les polyamines (présents à l'ordre du mM dans la cellule), la formation de fagots de MTs est également favorisée. En effet, les charges positives des polyamines neutralisent les queues c-terminales des tubulines (très négativement chargées), ce qui favorise la mise en fagots des MTs.

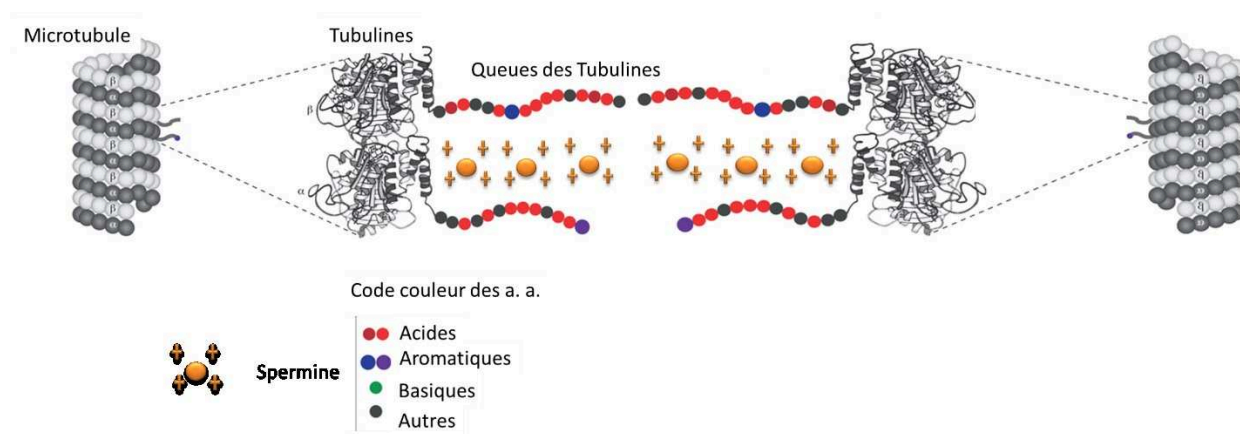


Figure III-46 : Mise en fagot des MTs facilitée par la présence de spermine (polyamine tétravalente). Image adaptée de Wehenkel et Janke (2014)⁸¹.

Par ailleurs, il a été montré par Hamon *et al.* que les MTs formés en présence de spermine étaient plus réactifs à une brève exposition au froid. Une explication rationnelle à ce phénomène est que la déstabilisation d'un MT donné au sein d'un fagot augmenterait la probabilité pour les MTs les plus proches d'être déstabilisés à leur tour^{233,247}. Ainsi, les anneaux de Tubuline-GDP libérés par la déstabilisation d'un MT pourraient polluer les extrémités des MTs les plus proches et provoquer une dépolymérisation massive (Figure III-47). D'autant plus que la formation de ces oligomères de tubuline-GDP sous la forme d'anneaux seraient stabilisés par les polyamines tétravalentes ce qui ralentirait la régénération de tubuline-GTP libre²⁴⁸. La combinaison de la proximité des MTs et de la stabilisation des intermédiaires de dépolymérisation (anneaux de tubuline-GDP) pourraient expliquer les phénomènes de catastrophes collectifs.

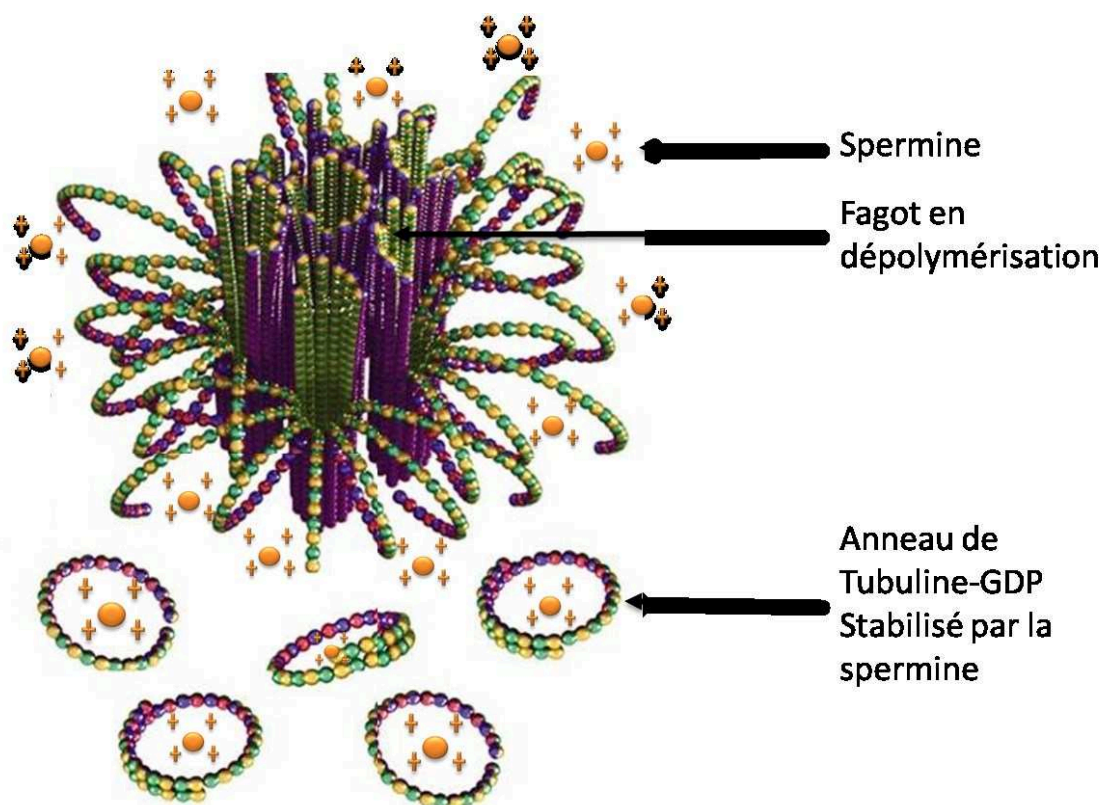


Figure III-47 : Formation d'anneaux de tubuline-GDP stabilisés par la spermine. Image adaptée de Ojeda-Lopez et al. 2014²⁴⁹.

In vivo, un tel comportement collectif pourrait être envisageable notamment dans les neurones où les polyamines jouent un rôle important sur le cytosquelette axonal et les jonctions communicantes²⁵⁰⁻²⁵². D'autant que dans l'espace confiné qu'est l'axone, si les MTs étaient disposés en fagots serrés, ils pourraient probablement être sujets à des dépolymérisations massives comparables à ce qui se produit en présence de cations multivalents.

C'est dans ce contexte que nous avons décidé d'explorer un effet attribué à Tau : la stabilisation. Comme cela a été mentionné dans le premier chapitre, la stabilisation des MTs axonaux est encore à ce jour énigmatique et nous nous sommes demandés si éliminer les contacts mur à mur entre MTs serait suffisant pour les stabiliser. En effet, l'espace créé par la protéine Tau pourrait suffire à inhiber le comportement collectif des MTs. Une autre possibilité serait que Tau change la nature des intermédiaires de dépolymérisation. Ainsi, nous avons voulu répondre à plusieurs questions de recherche :

- Est-ce que la séparation que permet Tau dans des fagots de MTs formés en présence de Spm est suffisante pour induire un effet de stabilisation à froid dans des conditions induisant généralement un comportement collectif ? Ou bien modifie-t-on la nature des intermédiaires de dépolymérisation : Tau limiterait alors le caractère polluant de ces structures.
- Puis, afin d'étudier les effets de Tau dans des conditions moins artificielles, nous avons tenté de caractériser l'effet de Tau en présence de spastine. Comme Tau, la spastine est une protéine importante pour la régulation de la dynamique des MTs. Toutefois, contrairement à Tau, qui les stabiliserait, la fonction principale de la spastine est de rompre les MTs. Ainsi, la spastine réduit la longueur des MTs, ce qui permettrait une production locale de tubulines libres et faciliterait la génération de nouveaux MTs^{66,253-255}.

Les résultats présentés dans cette partie sont des résultats préliminaires.

B. Effet de Tau sur les intermédiaires de dépolymérisation induits par le froid

1. Cinétique du désassemblage des MTs en présence de Tau

Lorsque l'on suit la polymérisation de 15 μM de tubuline, on constate sur la Figure III-48 que la concentration de Spm semble avoir un effet sur le temps de nucléation, la vitesse d'élongation et la concentration critique. Par ailleurs, la valeur du plateau croît proportionnellement à la concentration de Spm (4 fois plus élevée pour 1 mM de Spm comparé à la valeur contrôle). Ce phénomène pourrait être dû à l'assemblage de la tubuline en gros fagots de MTs, mais cette hypothèse doit être confirmée par AFM.

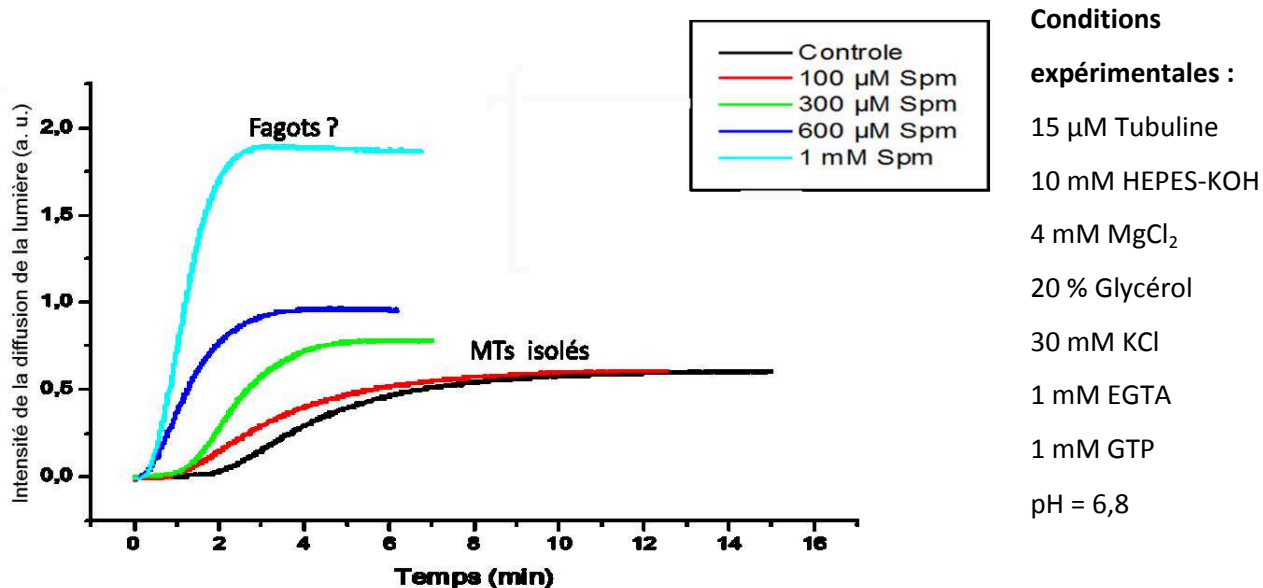


Figure III-48 : Courbes d'assemblage de 15 μM de tubuline soumis à un gradient de Spm suivies par turbidimétrie à 370 nm.

A la suite de cette expérience, nous avons utilisé la Spm à une concentration de 1 mM car c'est à cette concentration que le nombre de gros objets semble être le plus important. Conformément aux résultats présents dans la littérature, nous avons pu confirmer par AFM que cette concentration était suffisante pour induire la formation de fagots²⁹ (Figure III-49).

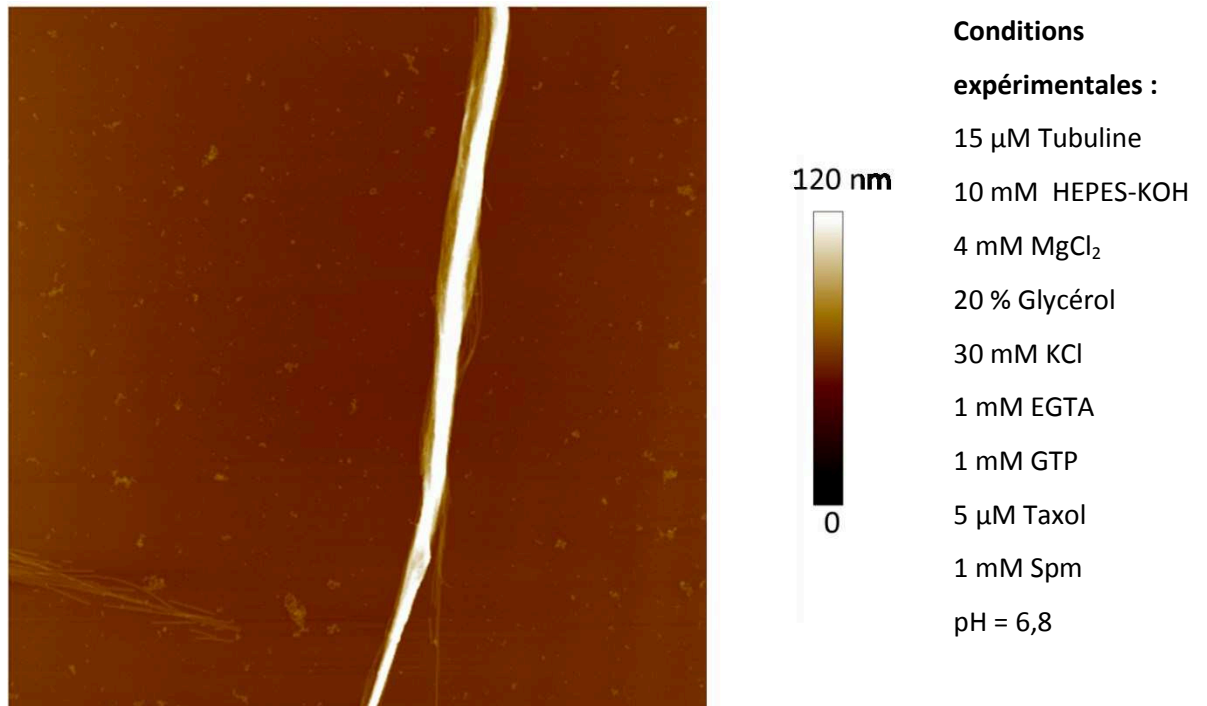


Figure III-49 : Fagots de MTs formés en polymérisant 15 μM de tubuline en présence de 1 mM de Spm à 37°C (image 15 x 15 μm^2).

Afin de savoir si la seule présence de Tau pouvait inhiber la sensibilité au froid de fagots de MTs formés en présence de Spm, nous avons étudié la cinétique de leur désassemblage par turbidimétrie selon le protocole indiqué sur la Figure III-50.

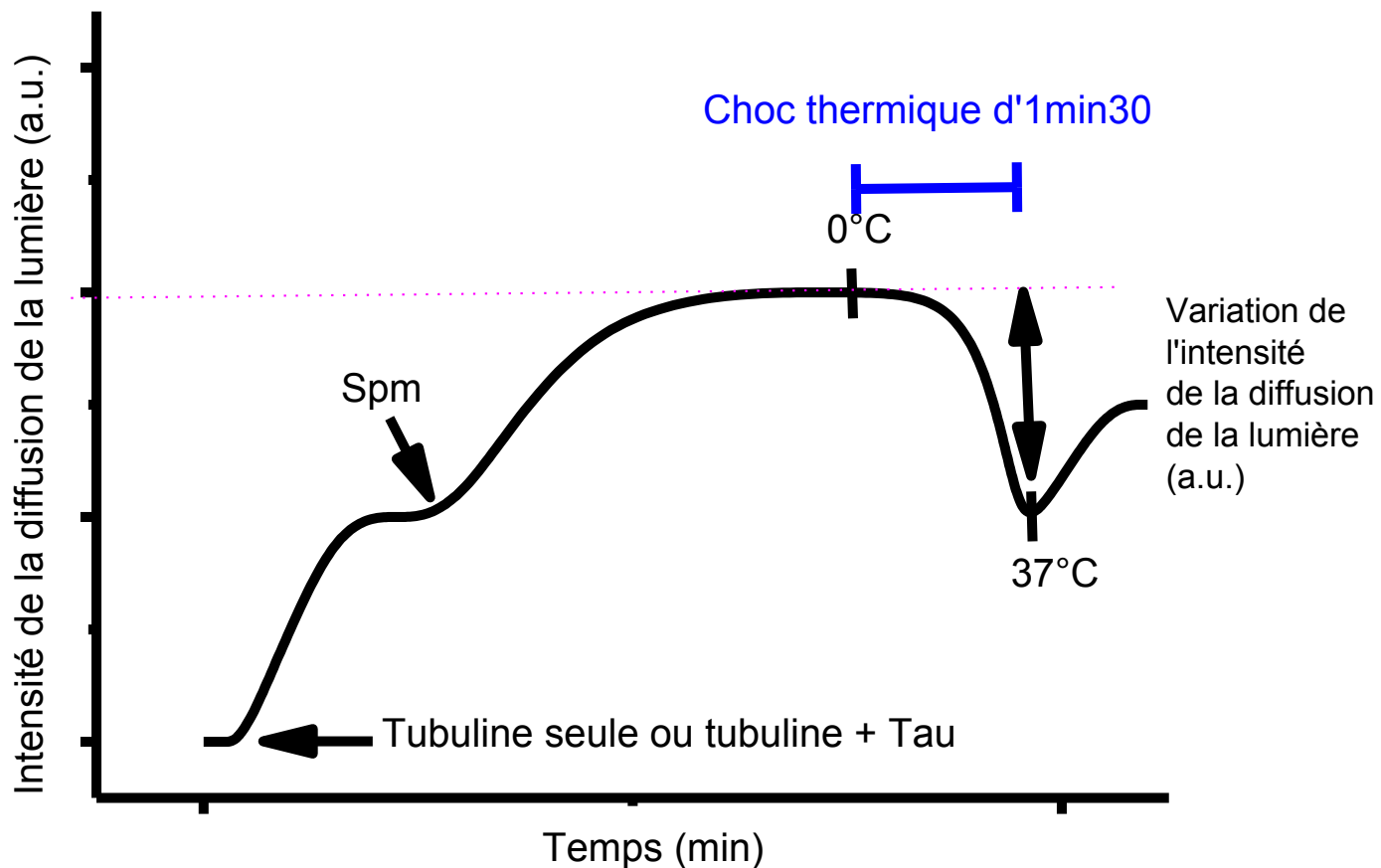


Figure III-50 : Variation de l'intensité de la diffusion de la lumière après un choc à froid de 1 min 30 suivi par turbidimétrie.

Ainsi, sur la Figure III-51, le point $t=0$ représente des MTs polymérisés en présence de Tau à différentes concentrations auxquels ont été ajoutés 1 mM de Spm. Une fois arrivés à l'équilibre, les MTs ont été placés 1 min 30 à 10°C. La mise en fagot due à la présence de Spm explique la valeur élevée du plateau ($A_{370nm} > 2$).

Dans ces conditions expérimentales, on constate que la sensibilité au froid des fagots de MTs caractérisée par l'amplitude de la chute du signal de turbidimétrie diminue au fur à mesure que la concentration de Tau augmente (tableau III-2).

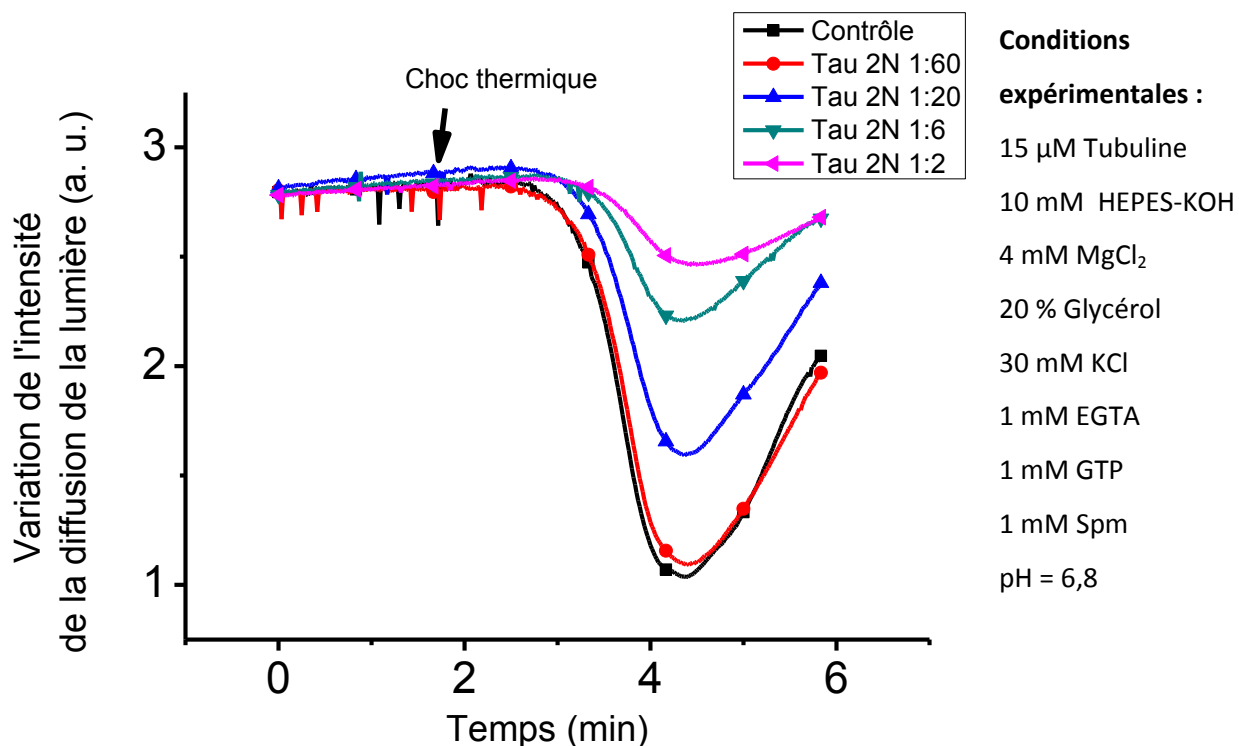


Figure III-51 : Cinétique de désassemblage MTs polymérisés avec un gradient de concentration de Tau auxquels 1 mM de Spm a été ajouté. Les MTs en fagots ont ensuite été soumis à un choc thermique de 1 min 30 suivi d'un retour à 37°C.

Ratio Tau2N : Tubuline	Amplitude de la chute
Contrôle	62%
1 :60	61%
1 :20	43%
1 :6	20%
1 :2	11%

Tableau III-2 : Pourcentage relatif de la perte de l'absorbance en fonction de la concentration de Tau 2N en présence de Spm.

Puis, nous avons refait la même expérience sans Spm pour vérifier si Tau stabilisait les MTs à froid. A des concentrations proches de la saturation, Tau induisant des fagots de MTs, l'intensité de la diffusion de la lumière est plus élevée au départ de l'expérience (Figure III-52).

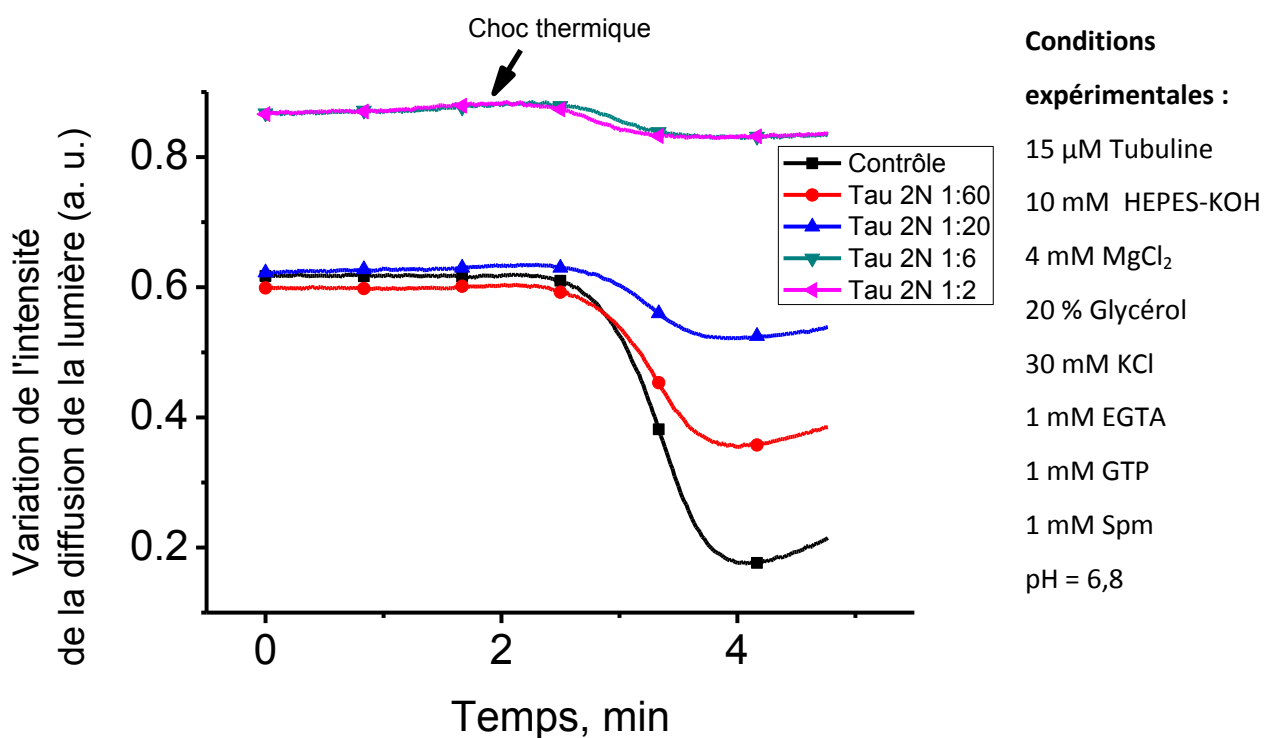


Figure III-52 : Cinétique de désassemblage des MTs polymérisés avec un gradient de concentration de Tau sans Spm. Les MTs en fagots ont ensuite été soumis à un choc thermique de 1 min 30 suivi d'un retour à 37°C.

Ratio molaire Tau2N : Tubuline	Amplitude de la chute
Contrôle	31%
1 :60	40%
1 :20	17%
1 :6	6%
1 :2	4%

Tableau III-3 : Pourcentage relatif de la perte de l'absorbance en fonction de la concentration de Tau 2N en l'absence de Spm.

On constate dans le tableau III-2 que :

- Dans les conditions contrôles sans Spm, l'amplitude de la chute est deux fois moins élevée que le contrôle réalisé en présence de Spm. Cela s'explique par l'absence de fagots :
 - Les anneaux de tubuline-GDP ne sont pas stabilisés,
 - Les MTs sont isolés donc les intermédiaires de dépolymérisations doivent parcourir une distance plus grande avant de rencontrer un autre MT et potentiellement le déstabiliser.
- L'amplitude de la chute est négativement corrélée à la concentration Tau 2N, puisque plus le ratio molaire Tau : Tubuline est élevé, plus les MTs sont stables à froid. Ainsi, Tau 2N semble protéger les MTs de la dépolymérisation à froid.

Comme il l'a déjà été signalé, les anneaux de tubuline-GDP jouent un rôle clé dans la sensibilité des fagots suite à un choc à froid. Ainsi, afin d'expliquer ces résultats, nous nous sommes donc focalisés sur les intermédiaires de dépolymérisation afin de vérifier par AFM si leur nombre ou leur structure évoluait en présence de Tau. Dans le but de mieux observer les différences entre les échantillons, nous nous sommes placés dans des conditions où on forme un maximum d'anneaux de Tubuline-GDP avec le contrôle Spm. Pour ce faire, nous avons polymérisé des MTs à 37°C (Figure III-53-A) puis nous les avons placés dans un bac de glace (4°C) pendant 30 secondes. On constate que dans les conditions contrôles sans Spm, la majorité des MTs est dépolymérisée et que des agrégats se sont formés. Cependant, sur certaines extrémités des MTs, nous avons observé des fourches de dépolymérisation, ce qui signifie que des anneaux de Tubuline-GDP avec une demi-vie très courte ont été formés (Figure III-53-B). Conformément à nos attentes, en présence de Spm et soumis au même choc thermique, nous avons trouvé très peu de MTs sur la surface mais, un grand nombre d'anneaux de Tubuline-GDP a été stabilisé (Figure III-53-C). Ces résultats sont conformes à ce qui a précédemment été observé dans la littérature²⁹. Lorsque la tubuline est polymérisée en présence de Tau, on constate qu'une grande partie des MTs assemblés semble intacts après le choc à froid. Cependant, nous sommes parvenus à observer des structures particulières à la dépolymérisation, telles que des fourches aux extrémités, et le long du MT (Figure III-53-D). Enfin, lorsque Spm est ajoutée sur des MTs assemblés en présence de Tau, on observe que des fagots de MTs sont présents sur la surface et la quantité d'anneaux stabilisés paraît inférieure à la condition contrôle sans Tau

(Figure III-53-E). Au terme de cette expérience, nous déduisons que la présence de Tau stabilise bien les fagots de MTs à froid. Il est cependant encore trop tôt pour spéculer sur les causes de cette stabilisation, mais elle semble liée à la diminution du nombre d'anneaux stabilisés présents en solution.

Choc à froid 30 sec (sans Tau)

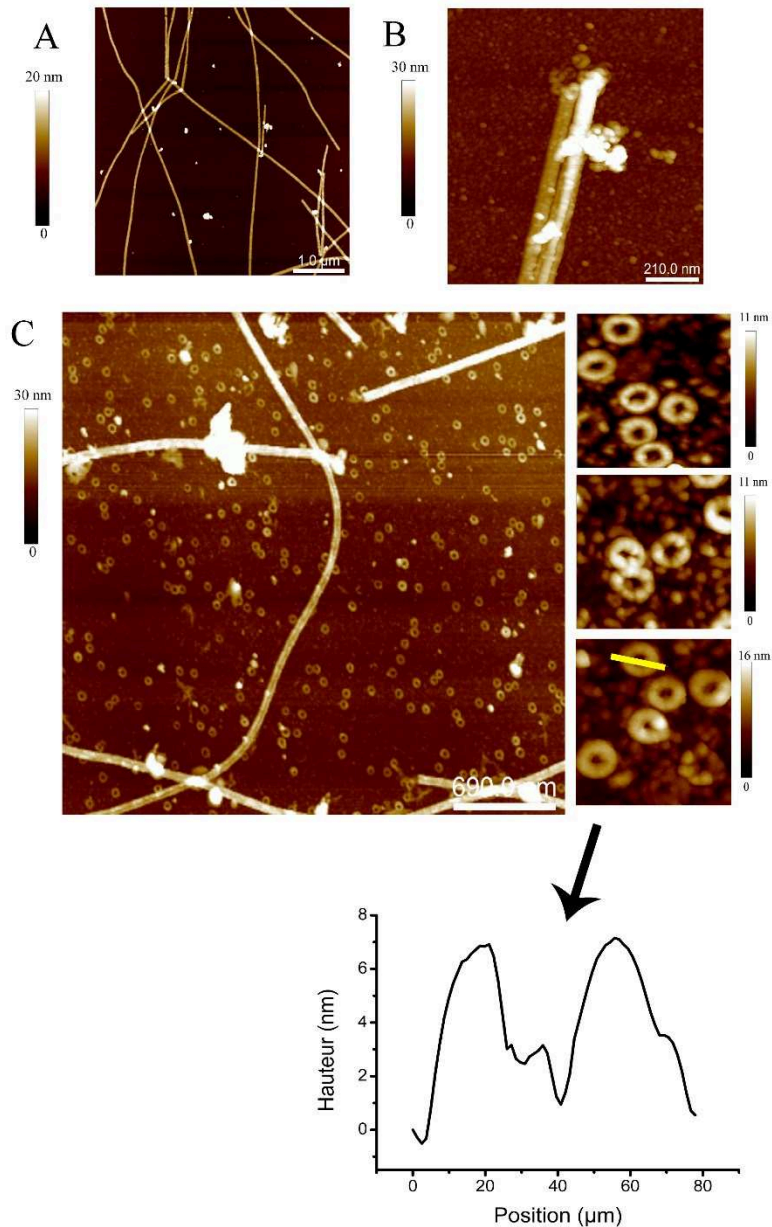


Figure III-53 : Stabilisation à froid des MTs en présence de 1 mM Spm lorsque Tau 2N est ajoutée avant Spm observée par AFM après un choc thermique de 30 secondes. (A) MTs contrôle avant choc

à froid sans Spm (B) MTs contrôle après choc à froid sans Spm (C) MTs + Spm après choc à froid + zoom de 200 nm².

Choc à froid 30 sec (avec Tau)

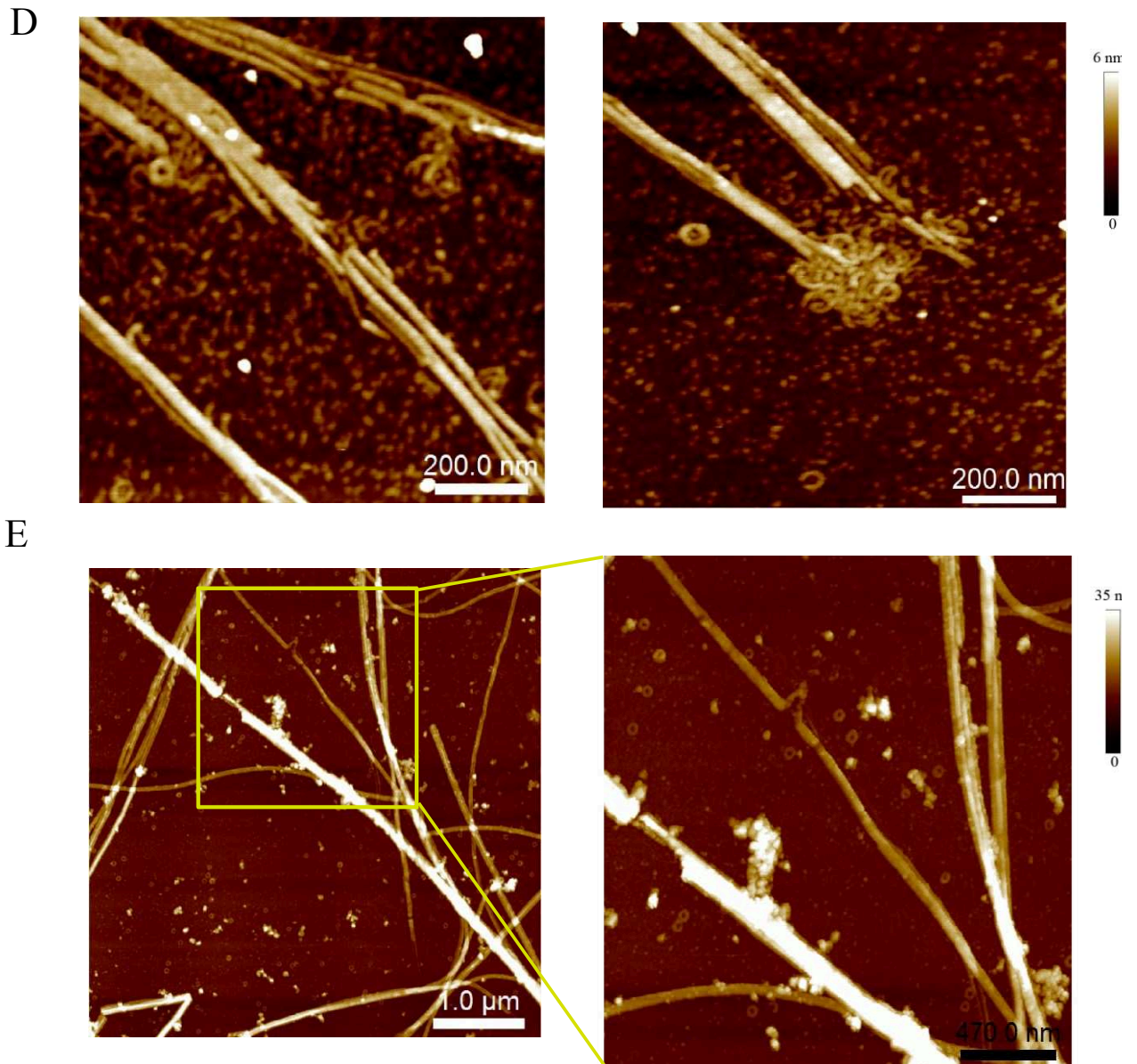


Figure III-53-bis : Stabilisation à froid des MTs en présence de 1 mM Spm lorsque Tau 2N est ajoutée avant Spm observée par AFM après un choc thermique de 30 secondes. (D) MTs + Tau contrôle après choc à froid (E) MTs + Tau après choc à froid sans Spm.

2. Intermédiaire de dépolymérisation en présence de Spastine

L'étude de la stabilisation des MTs par Tau vis-à-vis d'un choc à froid en présence de Spm est basée sur un système artificiel permettant d'évaluer le niveau de la stabilisation *in vitro*. Tau étant une protéine localisée dans l'axone, nous avons voulu observer son effet dans des conditions plus proches de ce qui s'y passe réellement. Nous nous sommes donc intéressés à son interaction avec la spastine, une protéine régulant négativement la taille des MTs.

La spastine est une protéine qui peut être exprimée sous 4 isoformes compris entre la forme pleine (spastine M1, 616 aa) et un variant délété des 86 premiers aa (spastine M87, 530 aa). Chacune de ces deux formes peut également être exprimée par l'épissage alternatif sans une séquence de 32 acides aminés codée par l'exon 4 (Figure III-54). Cependant, dans le travail qui suit, la construction utilisée est une forme murine tronquée de la spastine qui commence à l'acide aminé E227 (spastine-C389, 389 aa). Il a été montré que la spastine-C389 était la plus courte version de l'enzyme ayant une activité de coupure²⁵⁶. Cette isoforme comprend le domaine de liaison aux MTs et le domaine AAATPase⁷².

Le plasmide qui nous a permis de produire cette protéine, nous a généreusement été fourni par le Dr Carsten Janke.

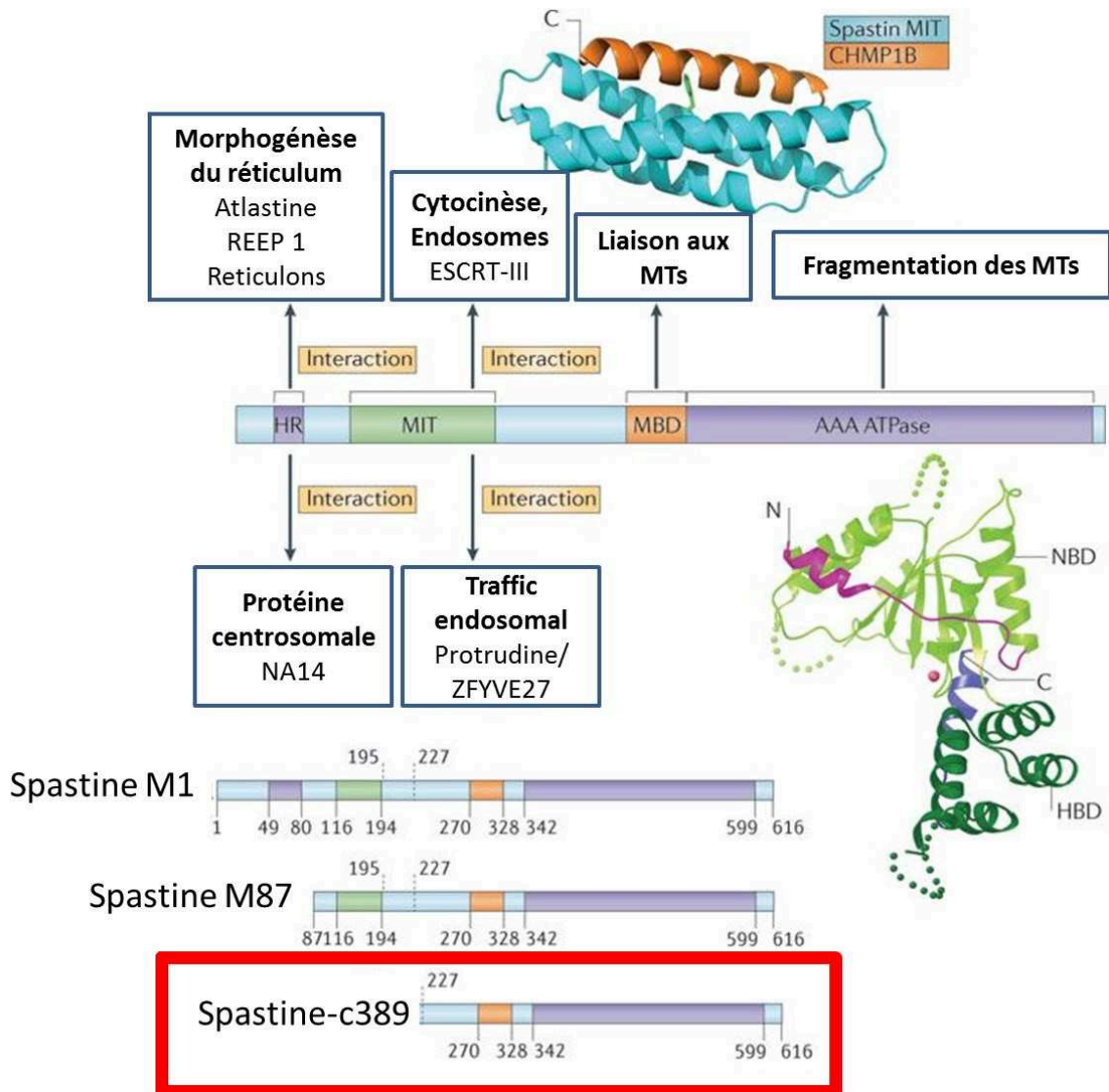
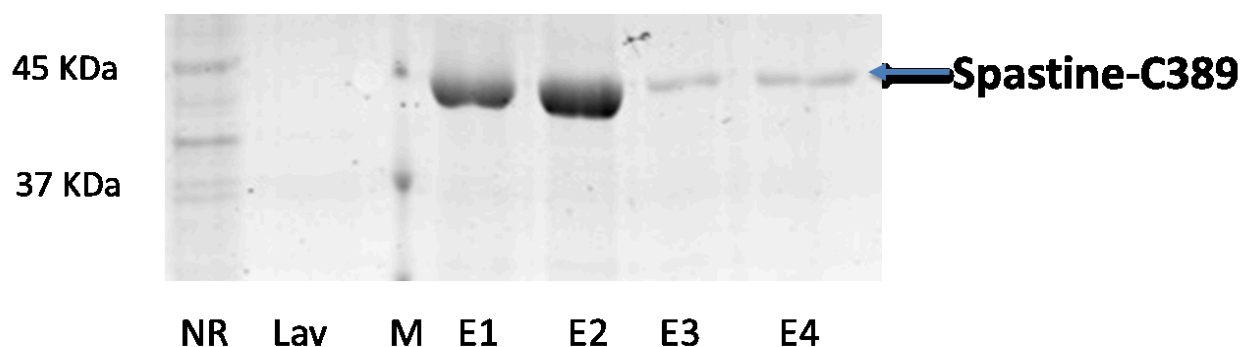


Figure III-54 : Structure des domaines de la Spastine et protéines avec qui elle interagit. HR est une région hydrophobe qui forme une boucle en forme d'épingle à cheveux intramembranaire. Le domaine MIT interagit avec les MTs et le trafic. Le domaine de liaison aux MTs (MBD) est nécessaire pour que la spastine se lie aux microtubules. Le domaine ATPase contient l'activité enzymatique de la protéine qui lui permet de rompre les MTs. Sur la structure, les hélices du groupe amine (N) et du groupe carboxy (C) sont représentés respectivement en magenta et en bleu. On voit également le NBD, un domaine de liaison au nucléotide et le HBD un domaine composé de fagots d'hélice se liant à la protéine REEP1. La protéine utilisée lors de cette étude est celle encadrée en rouge. Image adaptée de Blackstone, O'Kane, et Reid (2011)²⁵⁷.

La protéine a été exprimée dans des bactéries compétentes Rosetta Gami-2 et purifiée selon un protocole de purification gracieusement fourni par Benjamin Lacroix qui est issu de sa publication de 2010⁷² (Figure III-55).



NR : Fraction contenant les protéines non retenues par la phase fixe lors du passage du lysat

Lav : Fraction contenant les protéines faiblement retenues par la phase fixe et éluées par le tampon de lavage

M : Marqueur

E1 à E5 : Fractions contenant les protéines retenues par la phase fixe et éluées par le tampon d'éluion

Figure III-55 : Gel dénaturant associé à la purification de la protéine Spastine-C389 recombinante après purification sur colonne GST-Tag.

Nous avons ensuite testé l'activité de la protéine par vidéomicroscopie selon le protocole utilisé par Lacroix *et al*⁷². Nous avons ainsi constaté que la spastine-C389 recombinante que nous avons produite est capable de raccourcir les MTs. Dans nos conditions, la protéine est donc active (Figure III-56).

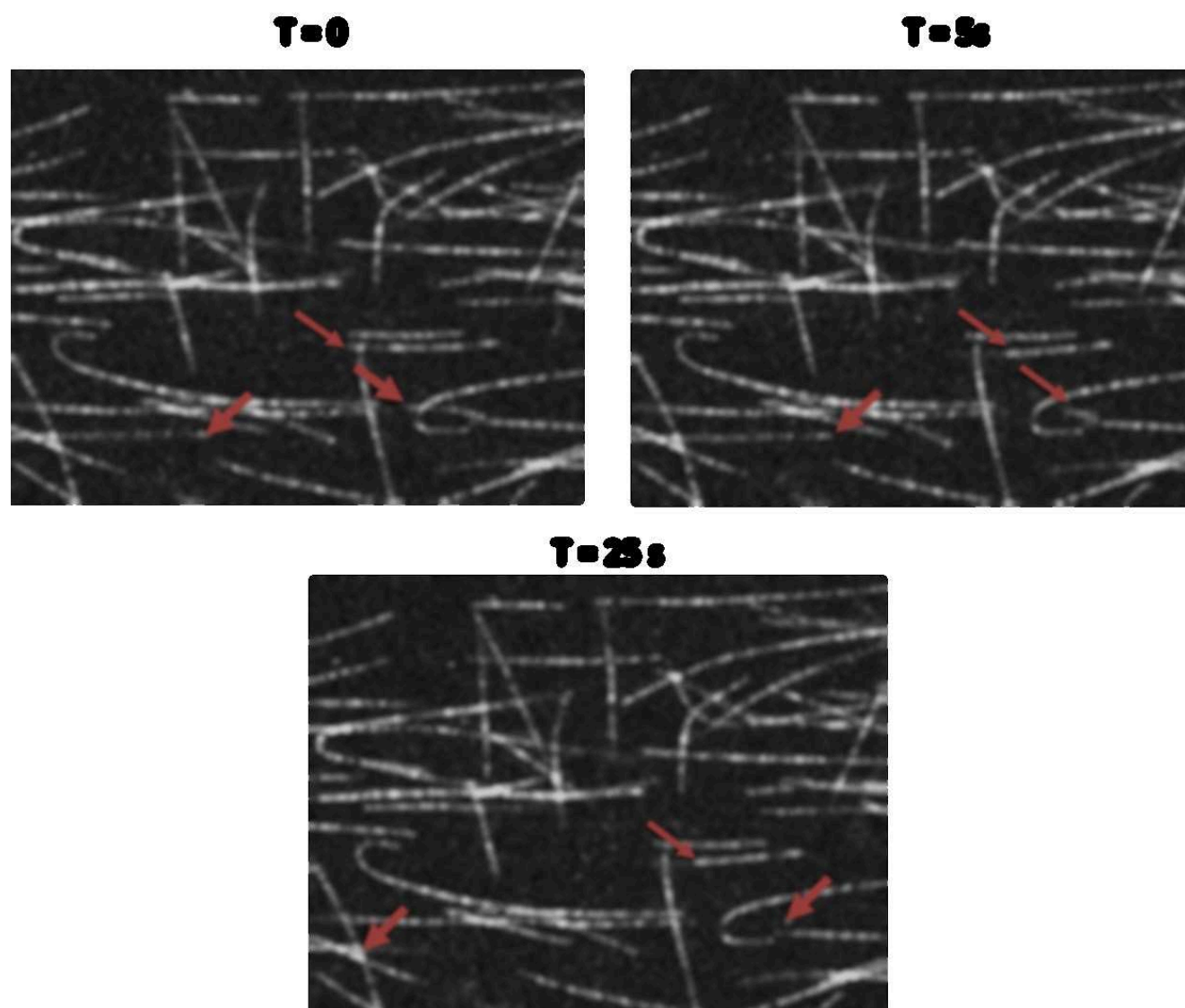


Figure III-56 : Cinétique de la déstabilisation des MTs en présence de spastine suivie par vidéomicroscopie. Les flèches rouges mettent en exergue trois exemples de MTs en dépolymérisation en fonction du temps.

Nous avons ensuite essayé d'observer par AFM la déstabilisation des MTs par la spastine. Les MTs ont été polymérisés puis incubés en présence d'un ratio molaire spastine:tubuline de 1:8 à 37°C. Nous avons ensuite déposé les MTs sur le mica à différents temps d'incubation afin de les imager.

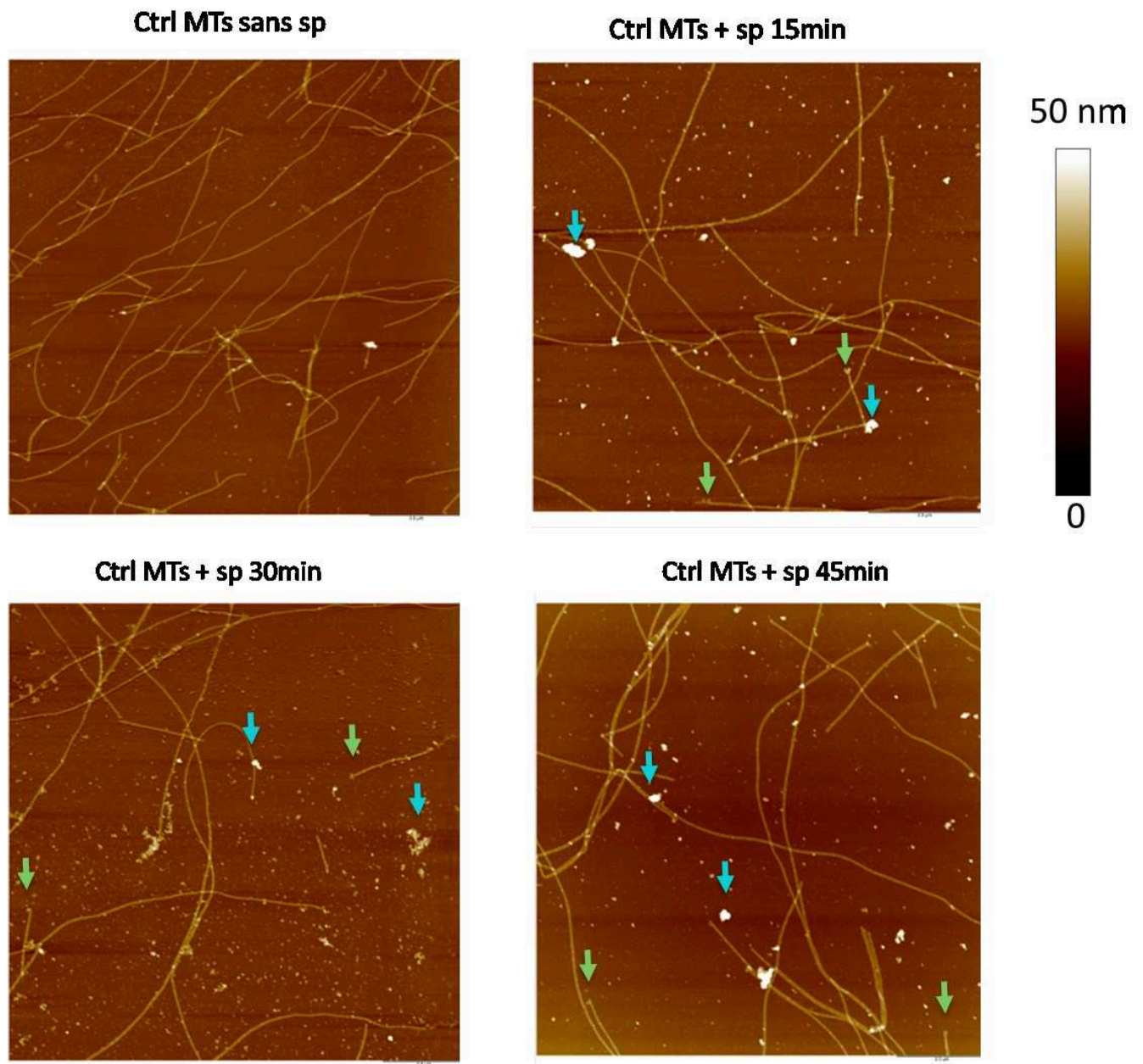


Figure III-57 : Cinétique de la déstabilisation de MTs en présence de spastine (Ratio Molaire Spastine : Tubuline de 1:8. Image AFM ($5 \times 5 \mu\text{m}^2$). Deux exemples d'agrégats et d'extrémités déstabilisées ont été mis en exergue respectivement à l'aide de flèches bleues cyan et vertes.

Une conséquence directement visible de l'activité de la spastine est la présence sur la surface de nombreux agrégats issus de la dépolymérisation des MTs, ils sont complètement absents des images de contrôle sans spastine (Figure III-57). Il apparaît aussi que la spastine induit la formation de fagots

de MTs conformément à ce qui a été reporté dans la littérature²⁴¹. Par ailleurs, la structure la plus caractéristique en présence de spastine est la fourche de dépolymérisation que l'on retrouve sur la majorité des extrémités des MTs. Ces différences sont statistiquement significatives (Figure III-58 et III-59).

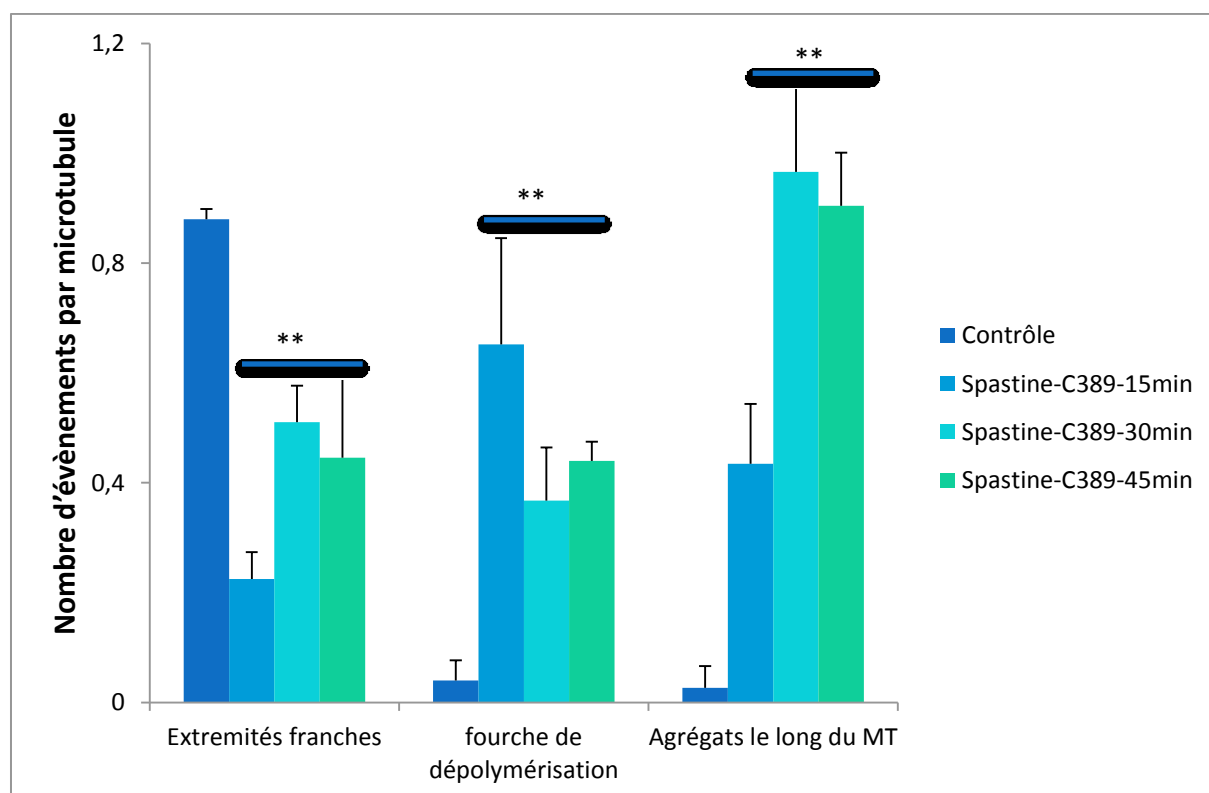


Figure III-58 : Nombre d'évènements par MT en fonction de la structure observée et du temps d'incubation. L'analyse statistique a été obtenue grâce à un test de Student bilatéral, **p < 0,01.

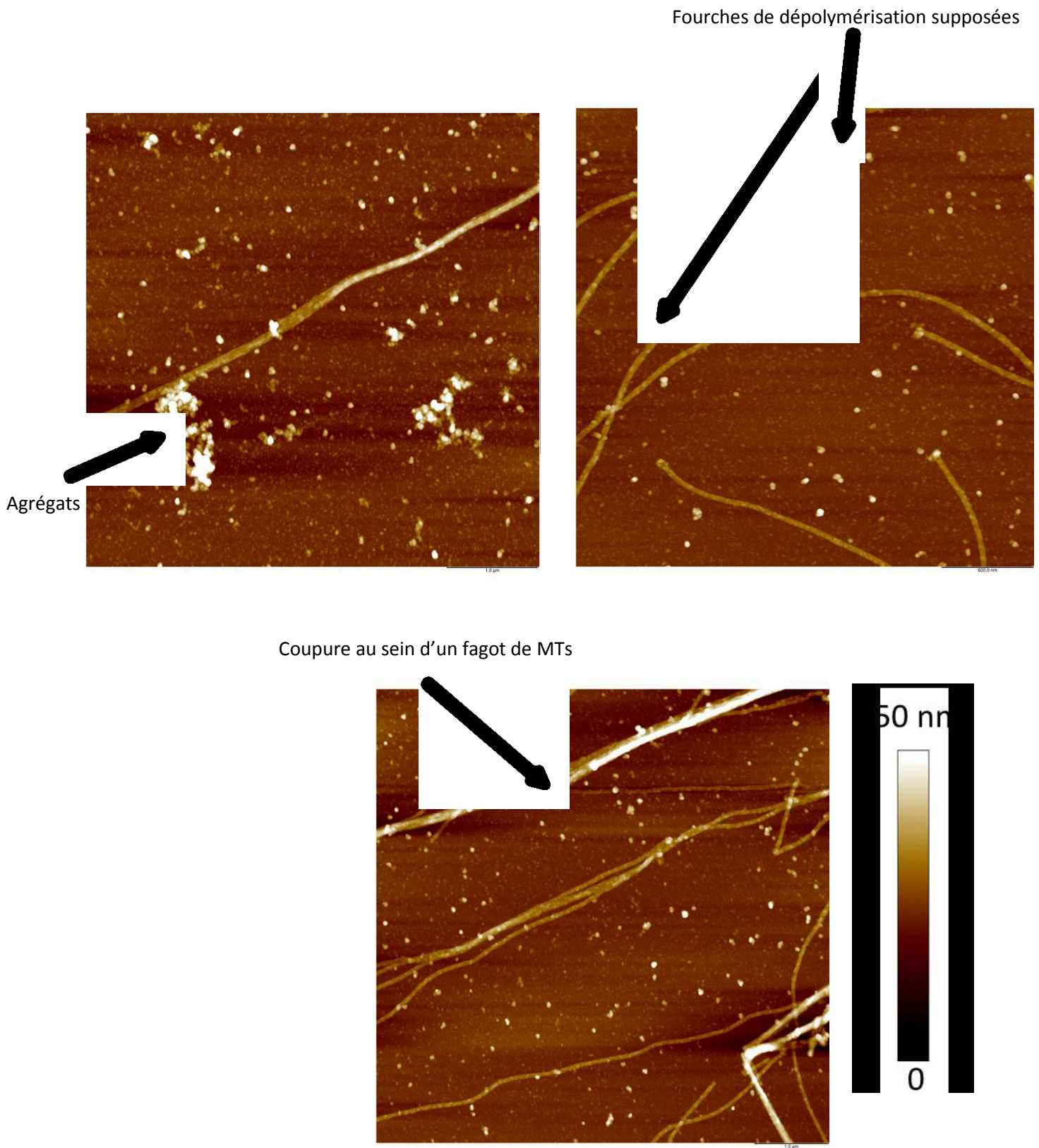
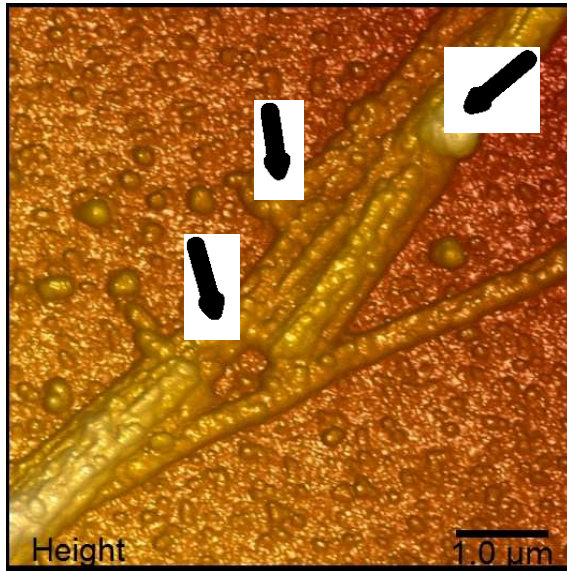


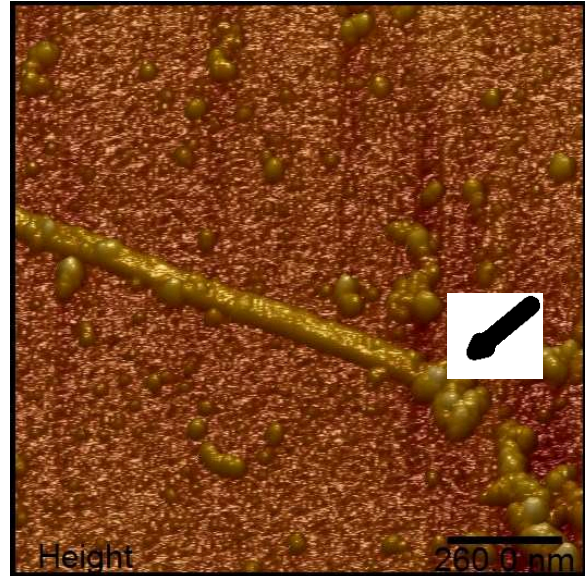
Figure III-59 : Zoom sur certaines structures caractéristiques de MTs déstabilisés par la spastine (3 x 3 μm).

Enfin, nous avons pu observer des structures particulières associées aux cassures (Figure III-60).

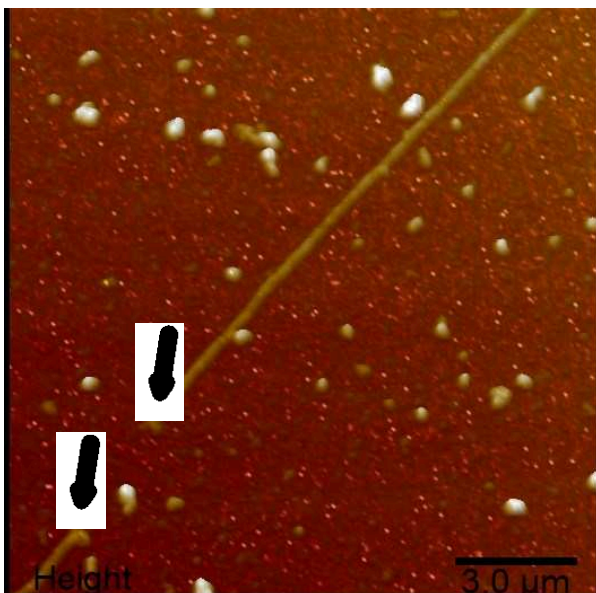
Coupure au sein d'un fagot



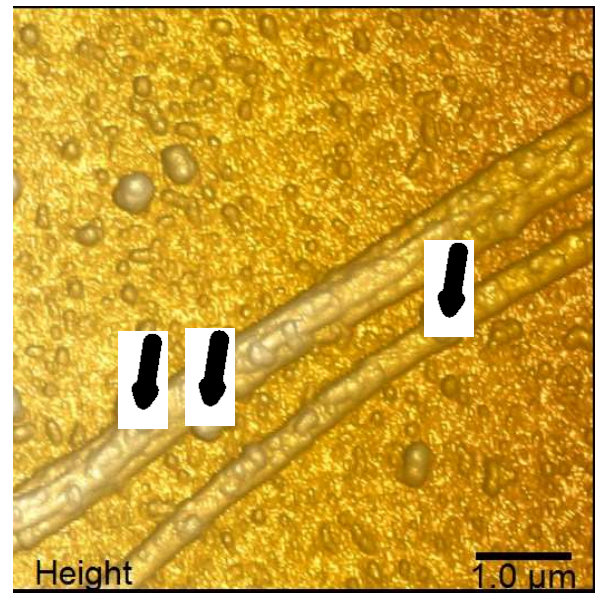
Fourche de dépolymérisation à l'extrémité d'un MT isolé



Coupure putative le long d'un MT isolé



Agrégats le long des MTs



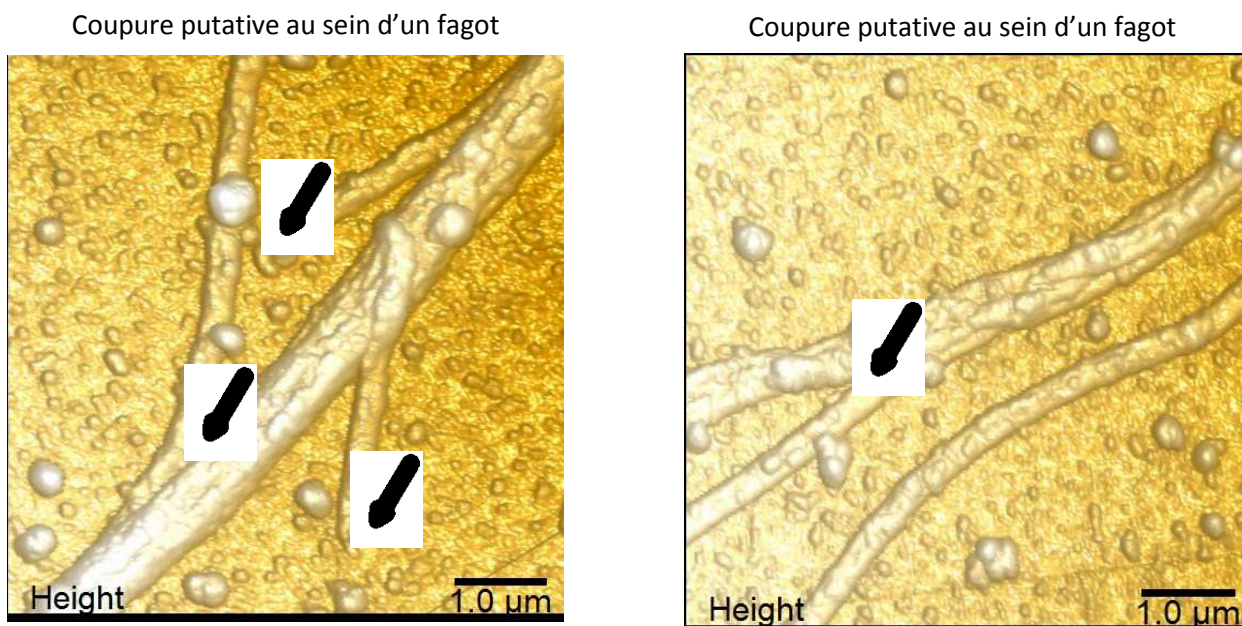


Figure III-60 : Zoom sur des structures particulières rencontrées en présence de spastine

C. Conclusions de la 3^e partie

Dans nos conditions expérimentales, les résultats obtenus montrent que Tau permettrait de stabiliser les MTs à froid notamment en inhibant la dépolymérisation collective. Cet effet est similaire à celui de MAP6²⁵⁸ qui stabilise également les MTs à froid. Cela pourrait être dû à la diminution du nombre d'anneaux de tubuline-GDP stabilisés en présence de Tau. En ce qui concerne les MTs déstabilisés avec la spastine, nous avons noté des structures particulières différentes des MTs déstabilisés avec le froid. Nous n'avons pas observé d'anneaux de tubuline-GDP, ce qui signifie que la spastine, bien qu'étant une protéine chargée positivement, ne stabilise pas les intermédiaires de dépolymérisation. En revanche, nous avons remarqué que des agrégats se formaient. A l'heure actuelle, l'origine de ces agrégats nous est encore indéterminée : il pourrait s'agir de tubulines libres ou de spastine agrégées sur la surface ou en solution. D'autre part, en présence de la protéine de fragmentation, les extrémités des MTs forment des fourches de dépolymérisation contrairement aux MTs contrôles où les bouts sont francs. Il nous reste cependant à étudier les structures observables en présence de Tau afin de déterminer si elles sont différentes et si Tau inhibe les cassures dues à la spastine.

Discussion

I. Dimérisation du domaine de projection de Tau

Dès 1978, Herzog et Weber²⁵⁹ ont suggéré que la protéine Tau pouvait former des agrégats à partir de son comportement par chromatographie de gel-filtration. Puis, d'autres études ont montré que Tau pouvait former des structures macromoléculaires²⁶⁰⁻²⁶². La capacité de la protéine à dimériser a notamment été observée par García de Ancos, Correas, et Avila (1993)²⁶³ par gel d'électrophorèse et par chromatographie d'affinité (Figure V-1).

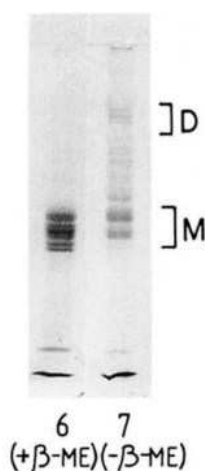


Figure V-1 : Gel d'électrophorèse de protéines Tau extraites de cerveaux porcins en présence (ligne 6) et en absence (ligne 7) de β -mercaptoéthanol. La présence de dimères et de monomères est indiquée respectivement par les lettres D et M. Image issue de García de Ancos, Correas, et Avila (1993)²⁶³.

Etant donné que les protéines Tau 3R possèdent un résidu cystéine, et que les protéines Tau 4R en ont deux, les recherches sur l'origine de la dimérisation se sont principalement concentrées sur la formation de ponts disulfures (dimérisation intermoléculaire)^{227,264}. Par ailleurs, la plupart de ces

travaux considéraient le fait que Tau puisse former des dimères comme un mécanisme de nucléation possible initiant l'agrégation pathologique de la protéine Tau²⁶⁵.

Cependant, lorsque l'on considère le milieu hautement réducteur qu'est l'axoplasme normal²⁶⁶, il est très peu probable que des ponts disulfures puissent s'y former. En outre, en ce qui concerne les formes 4R, les cystéines sont situées sur R2 et R3, ce qui rend plus probable la formation de ponts intramoléculaires (Figure V-2). Si tel est le cas, Tau n'existerait que sous une forme monomérique, avec son MTBDs immobilisé et son domaine de projection libre de s'agiter dans le milieu, exerçant ainsi uniquement des forces répulsives. Cette possibilité soulève le problème de l'espacement uniforme des MTs observés dans les fagots de MT axonaux en présence de Tau car elle s'apparente à la proposition de Mukhopadhyay et Hoh¹⁷³.

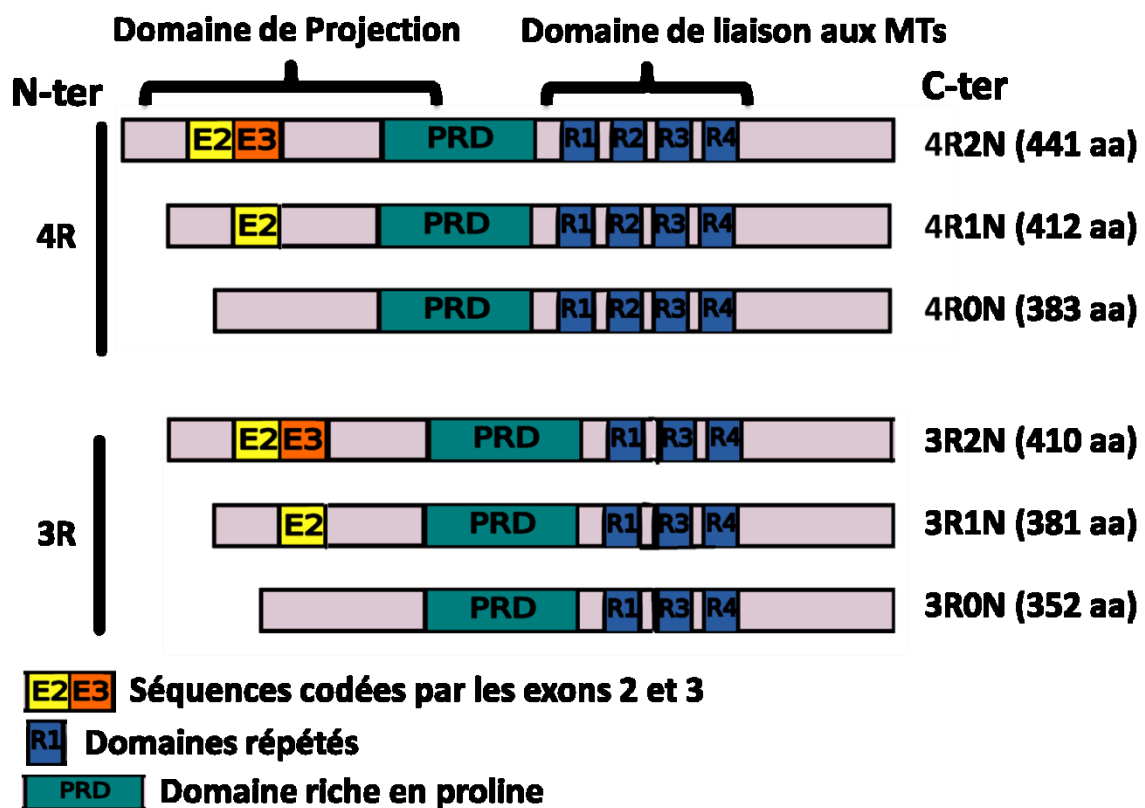


Figure V-2 : Rappels des différentes isoformes de Tau exprimées dans le système nerveux central.

Or, conformément au modèle du « cross-bridge », la microscopie électronique a révélé l'existence de ponts transversaux formés par une protéine supposée être Tau faisant le lien entre deux MTs adjacents en fagots¹⁴⁷. A cela s'ajoutent des données biochimiques qui démontrent la présence de dimères voire d'oligomères indépendants des ponts disulfures²⁶⁷ bien qu'aucune explication ne fût donnée sur le mécanisme par Makrides *et al.* Par la suite, il a été proposé par Rosenberg *et al.*⁴ que ce phénomène soit lié à des phénomènes électrostatiques. Le mécanisme évoqué est l'apparition d'un pont électrostatique généré par deux domaines de projection interagissant de manière antiparallèle. En effet, comme il a été mentionné dans la partie I, le domaine de projection est composé d'un cluster chargé positivement et d'un cluster chargé négativement (Figure V-3).

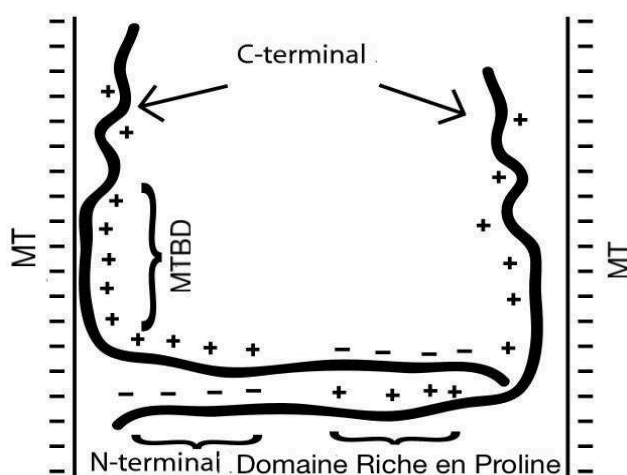


Figure V-3 : Représentation schématique du modèle du cross-bridge proposé par Rosenberg et al. (2008)⁴.

Durant nos expériences, nous avons retrouvé cette attraction notamment *in vitro*, au fur et à mesure que la concentration de Tau augmentait, des fagots de MTs se sont formés. Sans surprise, la propension à former des fagots dépendait de la longueur du domaine de projection : Tau 2N a engendré plus de fagots de Tau 0N. Par ailleurs, l'isoforme DeltaNT était incapable d'en induire. Enfin, il est important de noter que les fagots que nous avons observés étaient formés de MTs alignés et peu compacts (Tableau V-1).

Sans encombrement macromoléculaire	Tau 2N	Très faible ratio Tau : Tubuline	Peu de fagots
		Faible ratio Tau : Tubuline	Peu de fagots + MTs isolés
		Fort ratio Tau : Tubuline	« Fagots lâches »
	Tau 0N	Très faible ratio Tau : Tubuline	Pas de fagots
		Faible ratio Tau : Tubuline	Peu de fagots + MTs isolés
		Fort ratio Tau : Tubuline	Moins de « fagots lâches » qu'avec Tau 2N
	Tau DeltaNT	Très faible ratio Tau : Tubuline	Pas de fagots
		Faible ratio Tau : Tubuline	Pas de fagots
		Fort ratio Tau : Tubuline	Pas de fagots

Tableau V-1 : Tableau récapitulatif des résultats que nous avons obtenus en l'absence d'encombrement macromoléculaire.

Mis à part le rôle critique de la longueur du domaine N-terminal, cette attraction est dépendante de la force ionique du tampon. En effet, à une force ionique du tampon élevée, la proportion de fagots formée était inférieure à celle présente dans un tampon à faible force ionique. Ces résultats concordent avec ceux de Saunders et Donhauser²⁶⁸ dont l'étude porte sur le domaine de projection. Dans leurs conditions expérimentales, ils ont constaté qu'une solution à haute force ionique élimine les interactions Tau-Tau à longue portée ce qui est compatible avec des interactions de nature électrostatique. Il est donc probable que l'absence de détection de cross-bridges rapportée par certaines publications soit due à l'utilisation de trop fortes concentrations de sels ou de zwitterions^{159,235}. Toutefois, il n'est pas à exclure que l'augmentation de la force ionique diminue l'affinité de Tau pour les MTs ce qui *de facto* amoindrirait la propension à former des fagots.

II. Rôle de la dimérisation du domaine de projection dans l'environnement axonal

Selon le modèle de Rosenberg et al. (2008)⁴, une des fonctions essentielles de Tau dans les axones serait de réguler l'espacement des MTs en induisant la formation de fagots. Ce modèle est basé sur des analyses de cellules non neuronales où, lorsque Tau est surexprimée, des MTs en fagots sont observés¹⁴⁷. La taille des cross-bridges observée dans ces cellules est typiquement comprise entre 20 et 27 nm¹⁴⁷. Toutefois, comme cela a précédemment été mentionné dans le chapitre I, dans les coupes transversales d'axones de neurones matures, les MTs apparaissent plutôt espacés avec une distance supérieure (environ 75 nm)^{167,168,170}.

Ainsi, afin de tester cette première hypothèse, nous avons voulu examiner ce rôle putatif de Tau *in vitro* dans des conditions d'encombrement macromoléculaire comparables à celles de l'environnement axonal. Selon plusieurs estimations, la concentration de macromolécules dans la cellule (protéines, acides nucléiques, ribonucléoprotéines polysaccharides, etc.) varie entre 80 – 400 mg/ml^{37,38,269} ce qui correspond à un volume occupé de 5-40 %^{39,270}. A cause des interactions de volume exclu, l'espace disponible pour les molécules est très limité car deux molécules ne peuvent pas être au même endroit au même moment (cf chapitre I). D'ailleurs, dans de tels milieux, il est d'usage que l'espace moyen entre les macromolécules soit inférieur à la taille des macromolécules elles-mêmes²⁷¹.

Dans le cadre de notre étude, nous avons mimé l'encombrement macromoléculaire, en utilisant 1 % de PEG 35K dont le rayon de giration est proche de celui des protéines présentes dans le cytoplasme, environ 4–5 nm. En effet, l'utilisation de polymères neutres (PEG, Dextran, Ficoll) est courante pour obtenir une première approximation d'un environnement cellulaire surpeuplé^{272,273}.

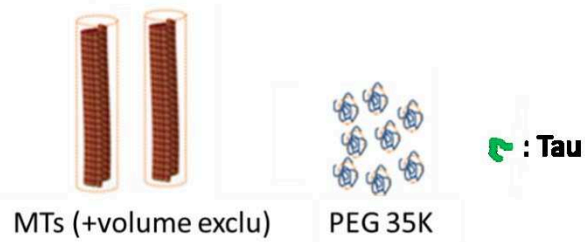
Dans ces conditions expérimentales, nous avons ainsi relevé que Tau avait un rôle biphasique :

- A faible ratio Tau:Tubuline, le domaine N-terminal s'oppose à l'effet de l'encombrement macromoléculaire, que ce soit sur des MTs dynamiques ou non, puisque des résultats similaires ont été obtenus en présence ou en absence de taxol.
- A fort ratio Tau:Tubuline, nous avons observé des MTs organisés en « fagots lâches » dont la distance inter-MTs centre à centre est d'environ 40 nm avec Tau 2N.

De plus, lorsque nous avons surexprimé Tau dans des cellules mammifères non-neuronales, nous avons constaté que :

- A faible ratio molaire Tau:Tubuline, aucune cellule ne produisait des fagots.
- A contrario, toutes les cellules où la protéine avait un niveau d'expression élevée, présentaient des fagots.

Conformément à ce qui avait été précédemment établi *in vitro*, ces résultats indiquent que la partie N-terminale régule négativement la mise en « fagots serrés » dans un environnement cellulaire encombré (Tableau V-2 et 3).



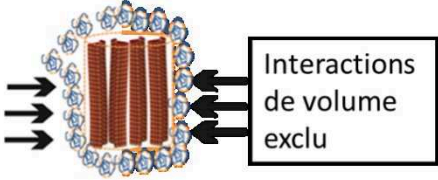
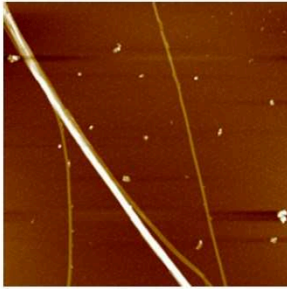
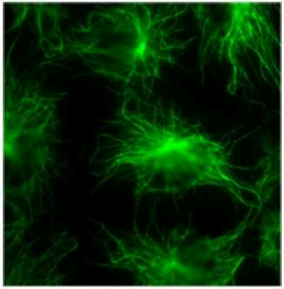
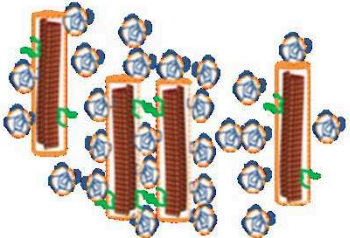
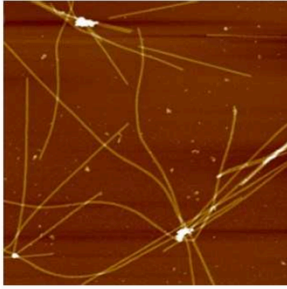
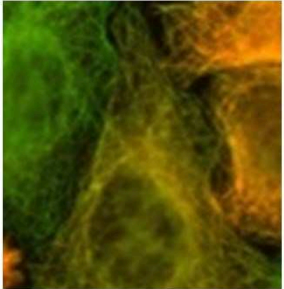
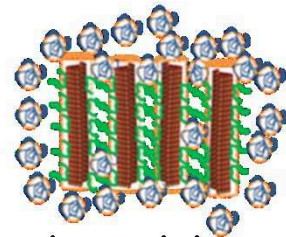
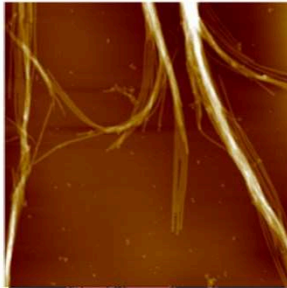
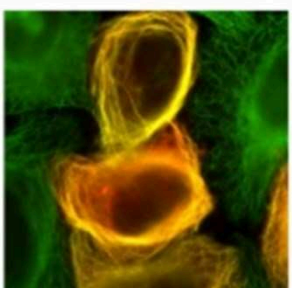
<p>Très faible ratio molaire Tau:tubuline</p> 		<p>1</p> 
<p>Faible ratio molaire Tau:Tubuline</p> 		<p>2</p> 
<p>Fort ratio Tau:Tubuline</p> 		<p>3</p> 

Tableau V-2 : Tableau récapitulatif des résultats obtenus dans des conditions d'encombrement macromoléculaire pour Tau 2N. (1) Cellules NRKs en fagots après un choc osmotique (sans surexpression) (2) MTs isolé dans des cellules HeLa où Tau 2N est surexprimée (3) MTs en fagots dans des cellules HeLa où Tau 2N est surexprimée.

Avec encombrement macromoléculaire	Tau ON	Très faible ratio Tau:Tubuline	Fagots serrés
		Faible ratio Tau:Tubuline	Peu de fagots
		Fort ratio Tau:Tubuline	Fagots « lâches »
	DeltaNT	Très faible ratio Tau:Tubuline	Fagots serrés
		Faible ratio Tau:Tubuline	Fagots serrés
		Fort ratio Tau:Tubuline	Fagots serrés

Tableau V-3 : Tableau récapitulatif des résultats obtenus dans des conditions d'encombrement macromoléculaire pour les Tau ON et DeltaNT.

Ces résultats concordent avec d'autres résultats présents dans la littérature. En effet dès 1994, Frappier *et al.*¹⁶² notaient la présence de fagots de MTs espacés en présence de Tau. Pour ce faire, ils surexprimèrent des formes humaines de la protéine Tau (Big Tau, un Tau de bas poids moléculaire et une forme de Tau sans N-terminal) dans des cellules Sf9 afin d'induire des neurites selon le procédé de Knops *et al.*, 1991¹⁴⁶. Ainsi, par microscopie électronique, ils purent montrer des différences entre la séparation spatiale des MTs en fonction de la longueur du domaine de projection de Tau (Figure V-4).

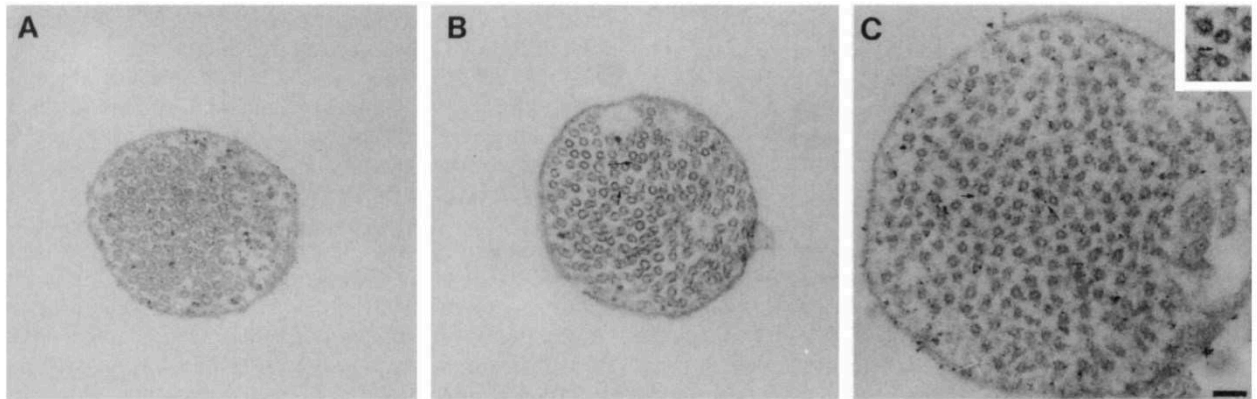


Figure V-4 : (A) Coupe de l'axone obtenu en surexprimant Tau tronqué en N-terminal (B) Coupe de l'axone obtenu en surexprimant Tau de bas poids moléculaire (C) Coupe de l'axone obtenu en surexprimant Big Tau. L'encart montre un cross-bridge entre deux MTs adjacents (Flèche). Image issue de l'article de Frappier *et al.* 1994¹⁶².

En l'absence du domaine de projection, les MTs sont très rapprochés puis au fur et à mesure que la longueur du domaine de projection augmente les MTs sont de plus en plus séparés (Figure V-5).

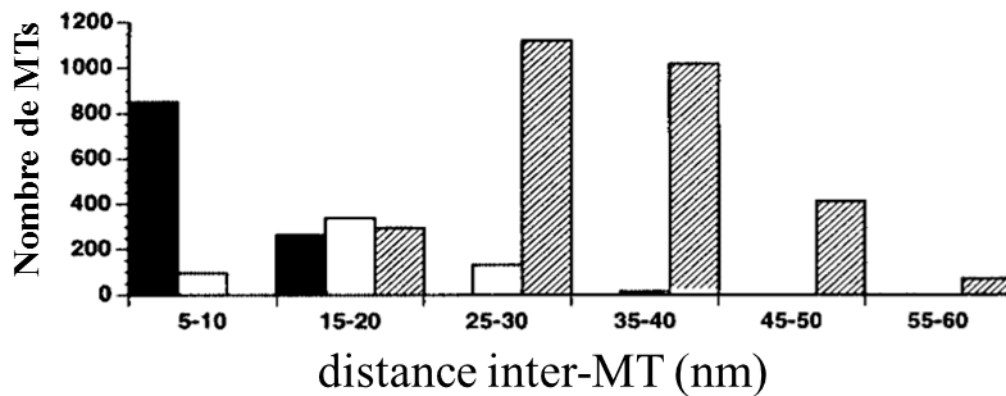


Figure V-5 : Distance centre à centre entre deux MTs adjacents en fonction l'isoforme (noir : forme de Tau tronquée, blanc : Tau de bas poids moléculaire, rayé : Big Tau).

Plus récemment, Derisbourg *et al.*²⁷⁴ ont identifié de nouvelles espèces de Tau tronquées en N-terminal dans le cerveau humain dont deux formes qui commencent aux résidus Met-11 et Gln-124. Afin de déterminer, si les résidus délétés protègent les MTs de la dépolymérisation, Tau 2N, Tau-Met11 et Tau-Gln124 ont été surexprimées dans des cellules N1E-115 qui ont ensuite été traitées pendant 20 minutes au nocodazole (drogue induisant la dépolymérisation des MTs). Outre les effets sur la stabilisation des MTs, on constate après traitement que les cellules exprimant Tau-Gln124 présentent plus de fagots que Tau 2N et Tau-Met11 (Figure V-6).

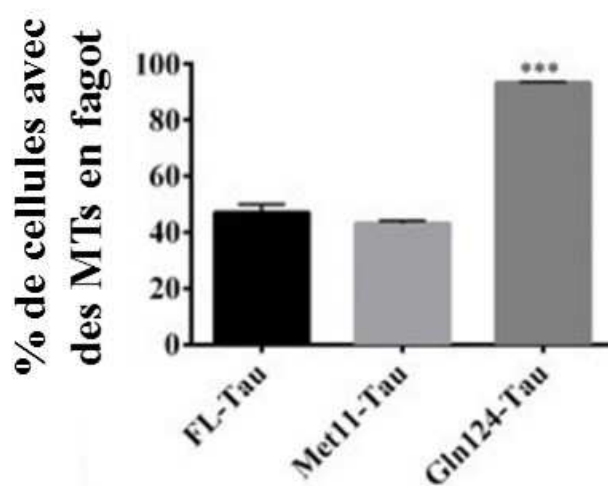


Figure V-6 : Quantification des cellules exprimant Tau 2N, Tau-Met11 ou Tau-Gln124 ayant des fagots de MTs après 20 minutes de traitement au nocodazole. Les barres d'erreur indiquent la SEM. ***: $P \leq 0,001$. Graphique adapté de l'article de Derisbourg *et al.* 2015²⁷⁴.

Ici aussi, la forme la plus tronquée inhibe le moins la mise en fagots. Cette différence de comportement pourrait s'expliquer par la quantité de charges négatives qui sont perdues à cause de la troncation (Tableau V-4).

Nombre de charges négatives perdues par rapport à Tau 2N	Tau-Met11	2,1
	Tau-Gln124	23,1
Charge global du domaine de projection (du 1^e résidu à P172)	Tau 2N	-16,1
	Tau-Met11	-14,1
	Tau-Gln124	4,9

Tableau V-4 : Nombre de charges négatives perdues par rapport à Tau 2N (estimation calculée avec « protein calculator » à pH = 7 pour des protéines sans modifications post-traductionnelles).

Ces résultats sont aussi concordants avec l'hypothèse selon laquelle le domaine de projection permet d'espacer les MTs. D'autant qu'il avait été établi auparavant par Takemura *et al.*²⁷⁵ que les MTs avaient une tendance à former des fagots après un traitement au nocodazole. En effet, il a montré par microscopie électronique qu'après avoir exposé des cellules COS au nocodazole, les MTs qui se reformaient étaient très étroitement alignés contrairement aux cellules non exposées (Figure V-7).

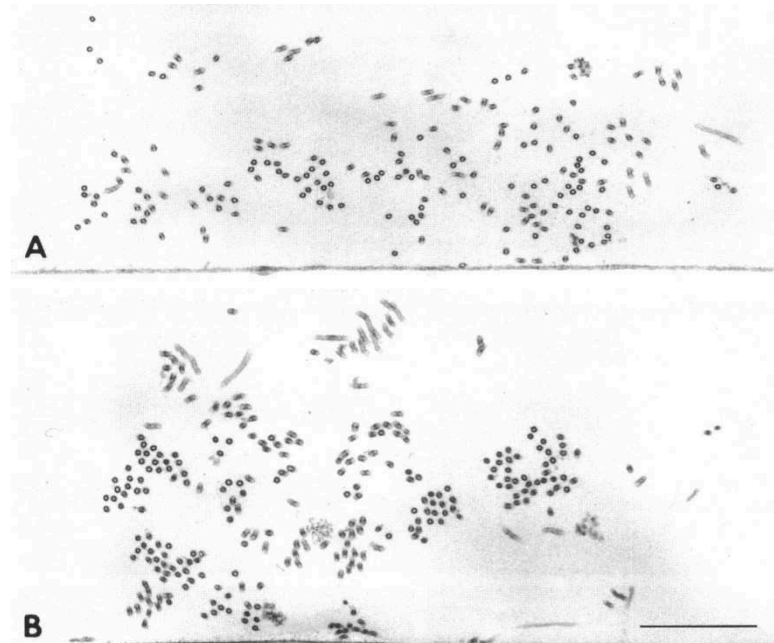


Figure V-7 : Coupe transversale de cellules COS observées par microscopie électronique à transmission de section mince. (A) Sans exposition à nocodazole ; (B) Après l'exposition au nocodazole. Barre d'échelle 0,5 μm . Image issue de l'article de Takemura *et al*(1995)²⁷⁵.

Ces résultats pourraient indiquer que les MTs sont énergétiquement plus stables quand ils sont en fagots plutôt que lorsqu'ils sont isolés. Dans ce cas, la mise en fagot serait due à des considérations énergétiques plutôt qu'à la présence d'un groupement exogène telles que les protéines Tau. Par conséquent, le rôle de Tau dans l'organisation axonale des MTs serait d'offrir une grande surface microtubulaire pour que les moteurs moléculaires puissent passer permettant ainsi le transport des vésicules, des mitochondries et de l'ARN le long de l'axone sur des longues distances.

III. Analyse du modèle de Mukhopadhyay et Hoh

Lorsque l'on considère Tau comme un objet permettant d'espacer les MTs, il est difficile de ne pas considérer le modèle de Mukhopadhyay et Hoh^{173,174}. Dans la théorie du « polymer brush », la séparation entre les MTs est due au domaine N-terminal de la protéine Tau qui, en adoptant très rapidement différentes conformations dans l'espace, agit comme une couche répulsive. Bien que ce modèle ne puisse pas être exclu, sa possible occurrence dans l'environnement axonal semble

douteuse. En effet, la formation d'une pellicule suffisamment dense et répulsive pour séparer les MTs nécessiterait qu'une couche continue de protéines soit sur la surface microtubulaire. En effet, si on considère le domaine N-terminal comme une chaîne de polymère, il a été déterminé expérimentalement qu'il faudrait entre 0,5 et 0,8 domaine de projection/nm² à la surface du microtubule pour initier un « polymer brush »^{276,277}. D'autant qu'en tenant compte de la mobilité relative de Tau à la surface du MT, ce chiffre augmente puisque Tau pourrait se repositionner loin de l'interface inter-MTs auquel cas, il lui serait impossible d'empêcher la mise en fagots serrés des MTs (Figure V-8). Cependant, dans le cadre d'un encombrement stérique efficace, l'hypothèse du polymer brush resterait valable. Cela équivaut, selon le modèle de Brittain et Minko¹⁷⁵, à une protéine Tau pour 6 dimères de tubuline.

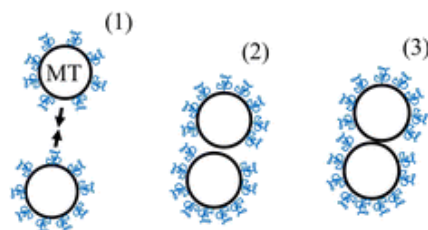


Figure V-8 : Représentation schématique du modèle du polymer brush lorsque Tau diffuse. (1) MTs s'approchant (2) Tau s'éloigne de l'interface entre les MTs (3) Fagots de MTs.

La pertinence du modèle de Mukhopadhyay et Hoh^{173,174} dépend donc du ratio molaire Tau:Tubuline dans les neurones, sachant que la concentration en tubuline est plus importante dans les axones qu'ailleurs, et que par conséquent, le nombre de MTs y est plus important. Or, nous savons que le ratio Tau:Tubuline est compris dans la littérature entre les valeurs 1:12 et 1:68¹⁷⁸⁻¹⁸⁰ ce qui représente une concentration trop faible pour permettre au modèle du polymer brush de s'appliquer. Cependant, comme nous l'avons discuté plus tôt (cf état de l'art partie II-E-3), ces concentrations ont été estimées à partir de neurones voire des cerveaux entiers et ne sont donc que très peu informatives quant à la situation axonale. Aussi, nous avons réalisé une estimation grossière de la concentration Tau dans le but d'obtenir une valeur spécifique à l'axone. Par l'intermédiaire d'une courbe de calibration de [Tau], nous avons obtenu un ratio molaire d'environ 1 tubuline pour

45 protéines Tau dans des axones corticaux de souris. Bien que ce ratio molaire Tau:Tubuline mérite d'être exploré plus en détail, il semble insuffisant pour que Tau forme une couche continue sur la surface des MTs capable d'initier un « polymer brush » permettant de garder deux MTs à distance. Par conséquent, Tau séparerait les MTs grâce à un autre mécanisme.

IV. Mécanisme proposé pour la séparation des axones par Tau

Comme expliqué précédemment, en l'absence de la protéine Tau, les MTs devraient former des fagots dans des conditions d'encombrement macromoléculaire. En théorie, deux MTs adjacents pourraient s'approcher l'un de l'autre par l'intermédiaire de la diffusion thermique sans obstacle apparent. Lorsque la distance de séparation entre ces deux MTs deviendrait inférieure à la portée r_p de l'interaction entre deux protéines, les MTs seraient irréversiblement attirés les uns vers les autres et formeraient des « fagots serrés »(Figure V-9).

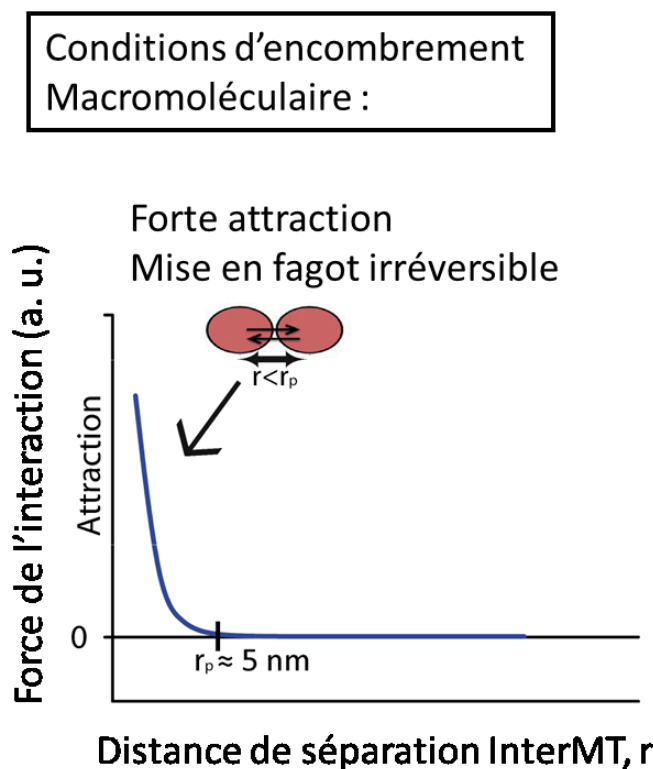


Figure V-9 : Courbe schématique des forces d'attraction exercées entre 2 MTs dues à l'encombrement macromoléculaire en fonction de la distance de séparation entre les microtubules

en l'absence de Tau. L'encombrement macromoléculaire induit une forte attraction à courte portée ($r < 5$ nm, la portée moyenne des protéines) et la formation de fagots de MTs serrés.

Cependant, en présence de la protéine Tau, sachant que des cross-bridges peuvent se former à l'interface des MTs lorsque deux MTs s'approchent trop l'un de l'autre, l'existence de barrières énergétiques peut empêcher la formation de « fagots serrés ». En effet, la portée r_c d'un cross-bridge (environ 20 nm) est largement supérieure à la portée r_p des interactions de volume exclu. Ainsi, lorsque la distance de séparation entre deux MTs est comprise entre r_p et r_c , Tau pourrait avoir le temps de diffuser sur la surface interMT avec la possibilité de former un cross-bridge à leur interface. Tau peut alors être considérée comme un ressort²⁷⁸ dont la compression explique l'existence de « fagots lâches » (Figure V-10).

Avec Tau mais sans encombrement macromoléculaire

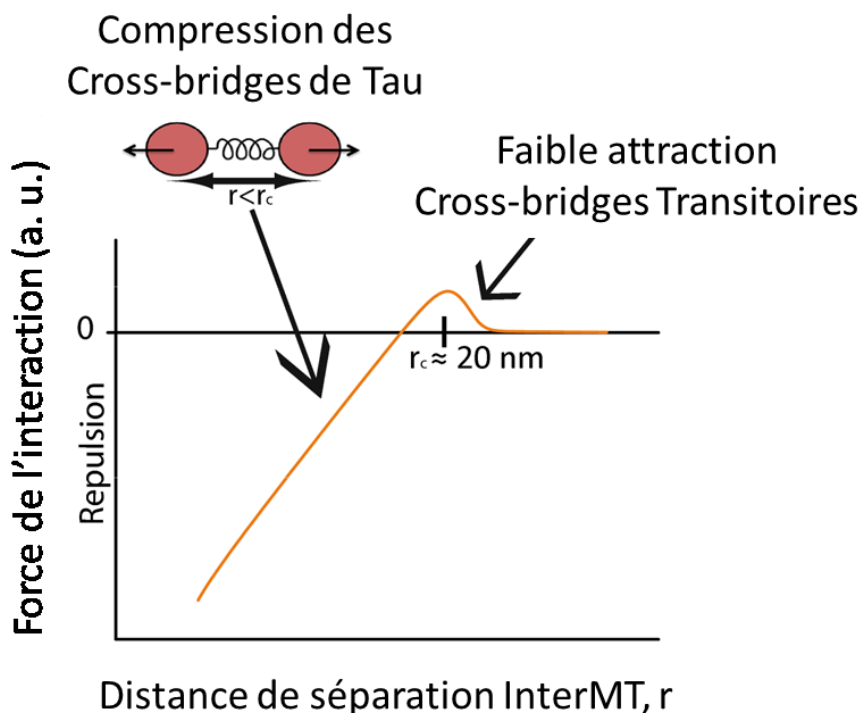


Figure V-10 : Courbe schématique des forces exercées entre 2 MTs en présence de Tau et en l'absence d'encombrement macromoléculaire en fonction de la distance de séparation entre les MTs. Lorsque l'écart entre les MTs est supérieur à r_c , les MTs sont isolés. Cependant, lorsque la distance inter-MT est d'environ 20 nm, la formation de cross-bridges entre deux MTs génère une attraction à

longue portée. Puis, au fur et à mesure que les MTs se rapprochent, les cross-bridges se compriment et génère une force de répulsion.

En conséquence, si on combine les effets dus à l'encombrement macromoléculaire et ceux dus à la formation de cross-bridges de Tau, nous notons l'apparition d'une barrière énergétique qui pourrait empêcher l'organisation des MTs en « fagots serrés » dans les axones (Figure V-11).

Avec Tau et encombrement macromoléculaire

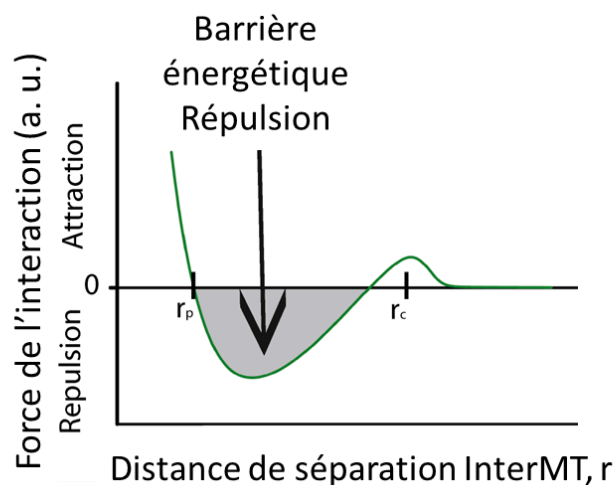


Figure V-11 : Résultante des forces dues à l'encombrement macromoléculaire et aux cross-bridges. Lorsque l'écart entre les MTs est supérieur à r_c , les MTs sont isolés. Puis, au fur et à mesure qu'ils se rapprochent, une attraction à longue portée est générée et des cross-bridges se forment lorsque la distance inter-MT ≈ 20 nm. Lorsque la distance inter-MT est inférieure à 20 nm, les cross-bridges agissent comme des ressorts et génère une force de répulsion qui permet aux MTs de repartir dans le sens opposé, les MTs se séparent. Toutefois, lorsque la force de répulsion n'est pas suffisante, les MTs continuent de se rapprocher et à une distance $< r_p$ des fagots serrés sont formés.

A partir de nos résultats expérimentaux, nous avons proposé un modèle alternatif expliquant comment la formation des cross-bridges de Tau à l'interface des MTs pourrait être à l'origine de la distance entre deux MTs dans un environnement encombré tel que les axones (Figure V-12).

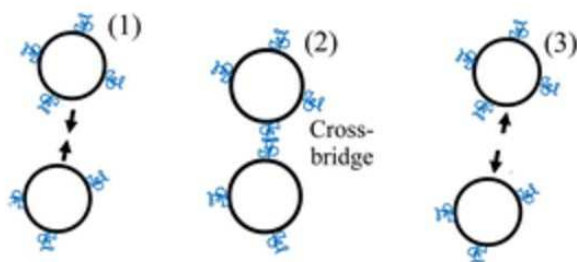


Figure V-12 : Modèle alternatif proposé basé sur les cross-bridges. Lorsque deux MTs s'approchent (1) Tau se place préférentiellement à l'interface entre les MTs et forme un cross-bridge transitoire qui agit comme un ressort (2) puis les MTs peuvent repartir dans la direction opposée (3).

Notre théorie est basée sur le fait que lorsque deux MTs s'approchent, Tau se placerait préférentiellement à l'interface interMT. La formation transitoire d'un cross-bridge empêcherait alors la création d'un « fagot serré ». En effet, Tau agirait comme un ressort ce qui permettrait aux MTs de repartir dans des directions opposées.

D'un point de vue énergétique, ce postulat est cohérent car :

- Il explique les résultats opposés que l'on retrouve dans la littérature. En effet, en raison de son rôle biphasique, seul un ratio molaire Tau : Tubuline élevé et une force ionique basse à modérée permettent la détection claire de fagots. Les précédentes expériences réalisées à de trop fortes concentrations en Tau ou en sels, ont apporté des visions biaisées de l'action de Tau. Cet effet biphasique sur l'organisation spatiale des MTs a notamment amené à croire de façon erronée que Tau promeut la mise en fagots *in vivo*, comme c'est le cas dans des cellules HeLa surexprimées.
- Peu de protéines Tau sont suffisantes pour inhiber la formation de fagots serrés, car Tau espace efficacement les MTs à faible ratio molaire Tau:Tubuline,
- Le gain énergétique dû à la formation de cross-bridges empêche Tau de s'écarter de la surface interMT.

V. Importance de la diffusion de Tau sur les MTs

Outre l'importance de la longueur du domaine de projection, au cours de nos expériences, nous avons remarqué que Tau inhibait l'apparition de fagots « serrés », dans des conditions d'encombrement macromoléculaire, à de très petites concentrations (Figure III-35).

Nous pensons que ce phénomène est dû à la diffusion de Tau sur les MTs. En effet, comme il l'a été montré récemment, Tau n'est pas immobile sur le MT mais diffuse le long du MT avec pour constante $D = 0,15 \mu\text{m}^2/\text{s}$ ^{176,177}. Ces mouvements Browniens permettent à la protéine d'explorer de larges surfaces de la matrice microtubulaire à la recherche d'autres protéines Tau. Afin d'en comprendre l'intérêt, les biophysiciens du laboratoire ont mis au point un modèle numérique qui décrit la diffusion de Tau sur le MT.

La Figure V-13, représente une simulation numérique où 10 MTs bougent dans une aire carrée de $300 \times 300 \text{ nm}^2$. Lors de cette simulation, il a été considéré que Tau forme des cross-bridges à l'interface inter-MTs et que la dimérisation de Tau peut être interrompue lorsque les MTs s'éloignent les uns des autres.

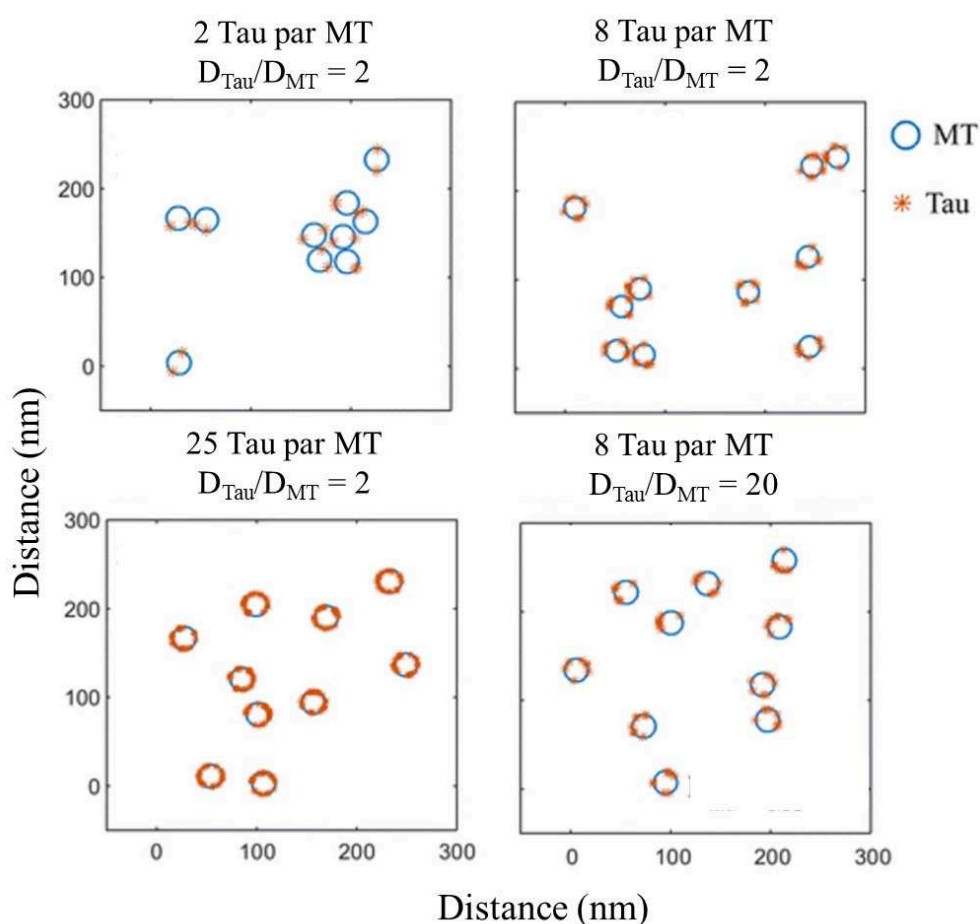


Figure V-13 : Simulations numériques de la distribution spatiale de 10 microtubules bougeant dans une aire de $300 \times 300 \text{ nm}^2$. Des protéines Tau 2N sont projetées avec différentes positions sur des MTs représentés de manière transversale. Le nombre N de molécules Tau par MT et la mobilité

relative de Tau, $D_{\text{Tau}}/D_{\text{MT}}$, sont indiqués sur la figure. $r_p = 5$ nm (rayon moyen d'une protéine) ; $r_c = 15$ nm (longueur moyenne d'un cross-bridge de Tau). Nombre d'itérations = 10000. L = la longueur des MTs est égale à 500 nm. Le choix des valeurs de $D_{\text{Tau}}/D_{\text{MT}}$ est basé sur la constante de diffusion théorique d'une molécule cylindrique. Cependant, comme D_{MT} n'a pas été mesurée dans les axones, cette valeur peut être considérée comme arbitraire.

Lorsque $D_{\text{Tau}}/D_{\text{MTs}} = 2$, si le nombre de Tau est égal à 2 par MT, les MTs sont en fagots. En revanche, lorsque le nombre de Tau passe à 8 puis à 25, le nombre de MTs isolés augmente. Parallèlement, pour un nombre fixe de Tau (ici 8 Tau par MT) lorsque $D_{\text{Tau}}/D_{\text{MTs}}$ passe de 2 à 20, le résultat est identique. Cette simulation permet de mettre en évidence la corrélation existante entre le nombre de Tau par MT et la mobilité relative de Tau sur la surface microtubulaire. En effet, plus Tau est mobile, moins le nombre de Tau sur le MT doit être élevé pour maintenir les MTs isolés car la surface balayée par Tau augmente. La mobilité de Tau sur le MT est donc un facteur critique pour expliquer l'efficacité du système à des ratios molaires Tau:Tubuline très faibles dans les axones. Pour souligner ce point, une approche numérique montre que le nombre de Tau nécessaire pour empêcher la formation de fagots de MTs décroît linéairement avec la mobilité relative de la protéine sur les MTs (Figure V-14).

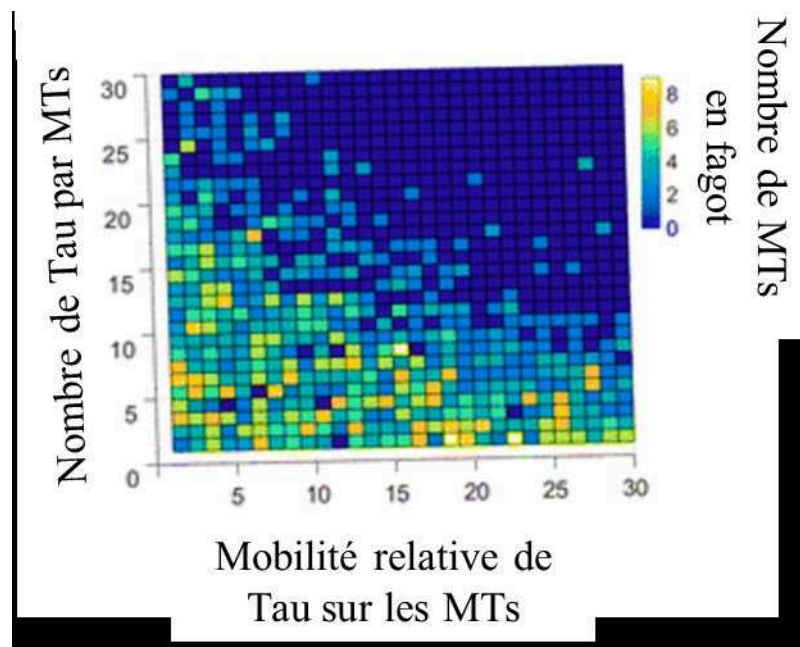


Figure V-14 : Nombre de MTs en fagots aux termes de la simulation numérique en fonction du nombre de protéines Tau 2N par MT et de la mobilité relative de Tau le long du MT. Les simulations ont été pratiquées avec les mêmes paramètres que pour la Figure V-13.

VI. Limites du modèle

De nombreuses approximations ont été réalisées lors des simulations numériques, par exemple la longueur du MT a été arbitrairement fixée à 500 nm. Etant encore inconnus à l'heure actuelle, d'autres paramètres expérimentaux ont eux aussi été choisis de façon arbitraire (ex : la constante de diffusion des MTs dans les axones D_{MT} , ou la viscosité de l'axoplasme).

Ainsi, les valeurs numériques obtenues aux termes des simulations doivent être aussi considérées comme arbitraires, c'est notamment le cas pour le nombre de protéines Tau requises pour inhiber la formation des fagots. Le but de l'analyse présentée ici n'est pas de fournir des valeurs exactes, mais plutôt de proposer un mécanisme permettant de comprendre les phénomènes qui régissent la séparation des MTs dans l'axone en particulier l'impact de la longueur du domaine N-terminal et de la diffusion sur l'efficacité de ce mécanisme.

D'autre part, un autre point qui a été ignoré lors de ces simulations est la variabilité structurale de la protéine Tau. Comme toutes les protéines intrinsèquement désordonnées, sa plasticité structurale est nécessaire à son répertoire unique de fonctions. Elle est stabilisée par des forces conformationnelles de différentes natures (liaisons hydrogènes, électrostatiques, hydrophobes, interactions de Van der Waals, ...) qui varient en fonction de l'environnement de la protéine²⁷⁹. Par exemple, dans notre cas, une force ionique élevée déstabilise les cross-bridges et limite la diffusion de la protéine¹⁷⁶. En outre, *in vivo* la structure de la protéine pourrait dépendre d'autres facteurs, d'ailleurs certaines conformations pourraient éventuellement donner lieu à un comportement pathologique, il a notamment été *in vitro* montré qu'avant l'agrégation, l'hyperphosphorylation de Tau s'accompagnait d'un passage de sa forme désordonnée à une forme partiellement repliée^{280,281}(Figure V-15).

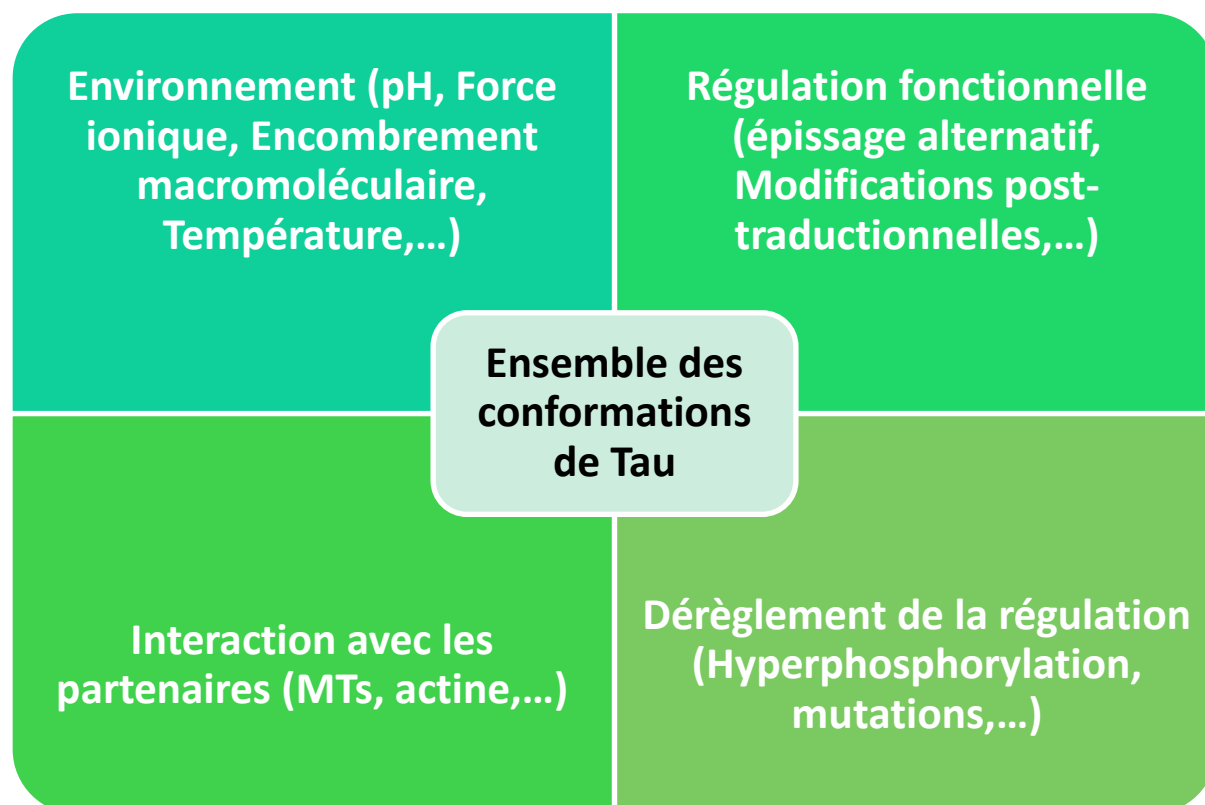


Figure V-15 : Exemple de facteurs pouvant induire des changements conformationnels de la protéine Tau.

A l'heure actuelle, la structure de la protéine Tau a été décrite sous de nombreux et très différents conformères²⁸²⁻²⁸⁶. L'utilisation du FRET a notamment permis à Jeganathan et al (2006)²⁸³ d'élaborer le modèle du « trombone » où les extrémités N-terminal et C-terminal se replient sur le MTBD (Figure V-16).

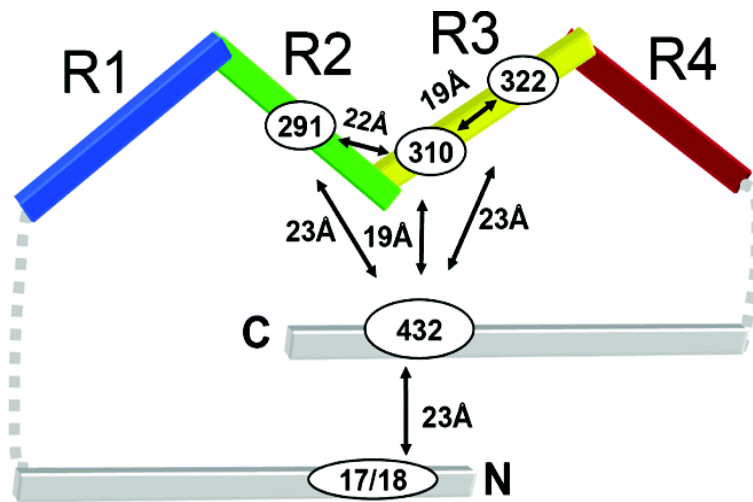


Figure V-16 : Repliement de Tau dans une suprastructure en forme de « trombone » en solution. Image issue de l'article de Jeganathan et al., 2006^{283,284}

Ainsi, outre les considérations environnementales, l'équilibre entre les différents conformères de Tau devrait aussi être pris en compte.

VII. Rôle de l'épissage alternatif dans la formation de cross-bridges

La combinaison de nos résultats expérimentaux et des simulations effectuées par les biophysiciens du laboratoire montre que la longueur du domaine de projection joue un rôle critique sur l'efficacité de la séparation des MTs par Tau (Figure V-17). En effet, nous avons observé une corrélation positive entre la longueur de ce domaine et la séparation des MTs.

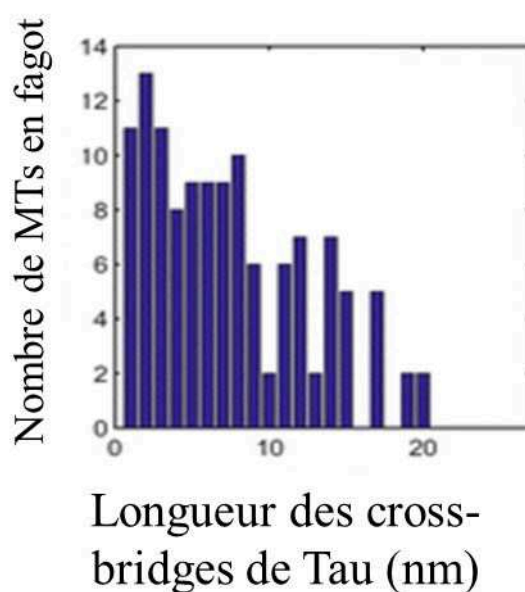


Figure V-17 : Simulations numériques indiquant le nombre de MTs en fagots en fonction de la longueur du domaine N-terminal effectué pour 20 MTs bougeant dans une aire de $350 \times 350 \text{ nm}^2$. Le nombre d'itérations est égal à 10000. $D_{\text{Tau}}/D_{\text{MTs}} = 3$. Les autres paramètres sont les mêmes que pour la Figure V-13.

Les résultats présentés ici indiquent que l'isoforme Tau 2N est le plus efficace pour empêcher le tassement des MTs dans des conditions d'encombrement macromoléculaire. Cette observation est directement liée à l'épissage alternatif et pourrait expliquer pourquoi au cours de la neurogénèse les protéines Tau sont exprimées différemment.

En effet, les isoformes avec un domaine N-terminal court ont une expression réduite dans le cerveau adulte. On peut constater sur la Figure V-18 que les isoformes 0N sont presque absents du cervebellum et du néocortex adulte. En revanche, l'isoforme 2N/4R est le plus exprimé²⁸⁷.

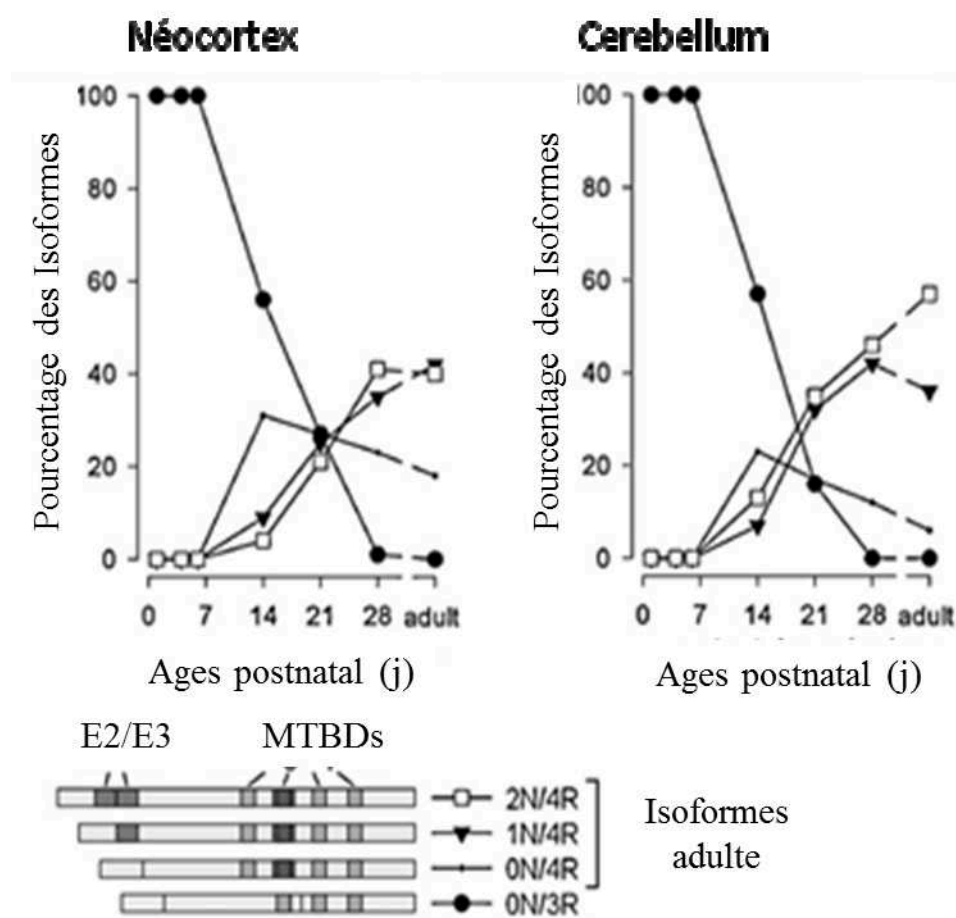


Figure V-18 : Expression de différents isoformes de la protéine Tau dans le néocortex et le cerebellum du rat durant le développement. Image issue de l'article de Bullmann et al. (2009)²⁸⁷.

Par ailleurs, l'architecture génomique dans la région couvrant le locus MAPT est caractérisée par deux grandes haplotypes : H1 et H2. L'haplotype H1 montre une forte association aux maladies neurodégénératives sporadiques, la paralysie supranucléaire progressive et la dégénérescence cortico-basale. Les mécanismes pathologiques derrière cette prédominance semblent liés à un déséquilibre dans le ratio des isoformes 3R/4R^{122,123,288,289}. A contrario, il a été montré que l'haplotype H2, qui exprime deux fois plus d'isoformes Tau 2N, « préserve » des maladies associées à H1²⁹⁰. Par conséquent, l'inclusion des exons 2 et 3 pourrait potentiellement conférer une protection contre les maladies neurodégénératives. De ce fait, si la séparation spatiale des MTs dans les axones

matures est inhérente aux protéines Tau 2N ou 1N, cela pourrait expliquer que leur expression augmente au fur et à mesure que le neurone se développe.

VIII. Impact sur le transport axonal

Le rôle de Tau sur le transport axonal actif (médié par les moteurs moléculaires) a été analysé par plusieurs rapports qui mettent en avant un effet régulateur^{158,291,292}. Par ailleurs, il a également été rapporté que certaines altérations de Tau affectent ce mécanisme. On peut notamment citer :

- L'hyperphosphorylation^{293,294},
- Mais aussi la surexpression, qui inhibe le transport *in vitro*^{156,295} et *in vivo*²⁹⁶ à des degrés différents en fonction des isoformes concernés^{158,291,292,297}.

Toutefois, en l'absence de Tau, le transport semble intact¹⁵⁵. Par conséquent, il est difficile de déterminer les mécanismes moléculaires et physiologiques directement impliqués dans ce processus. Cependant, une hypothèse émise par Marx semble faire consensus dans la communauté scientifique. Elle implique qu'il y aurait une compétition stérique entre Tau et les différents moteurs moléculaires pour l'espace sur la surface du MT^{298,299}.

En dépit de preuves biochimiques convaincantes²⁹⁵, l'application de cette hypothèse dans des conditions *in vivo* n'est toujours pas claire. En effet, malgré la profusion de rapports signalant que la protéine Tau altère le fonctionnement des moteurs moléculaires^{156,300,301} dans des conditions de surexpression, le doute est encore permis pour les conditions physiologiques. En effet, il ne semble pas évident qu'en temps normal, Tau inhibe le transport actif des cargos dans les axones où sa concentration est faible (selon nos estimations 1:45). Au contraire, sa capacité à diffuser le long des MTs et à former des cross-bridges pour maintenir les MTs séparés pourrait le favoriser.

D'ailleurs, le fait que le rôle déterminant de Tau dans l'espace inter-MTs puisse avoir un impact sur le transport vésiculaire axonal a déjà été proposé par le passé. Par exemple, il a été suggéré que l'état de phosphorylation de Tau permettrait de réguler la création de « tunnel »^{302,303} :

- La déphosphorylation libérerait Tau des MTs ce qui diminuerait de l'espace entre deux MTs adjacents et par conséquent, ouvrirait un passage pour les cargos,
- La rephosphorylation de Tau après le passage de la vésicule permettrait de pousser la cargaison et de l'aider à avancer plus facilement (Figure V-19).

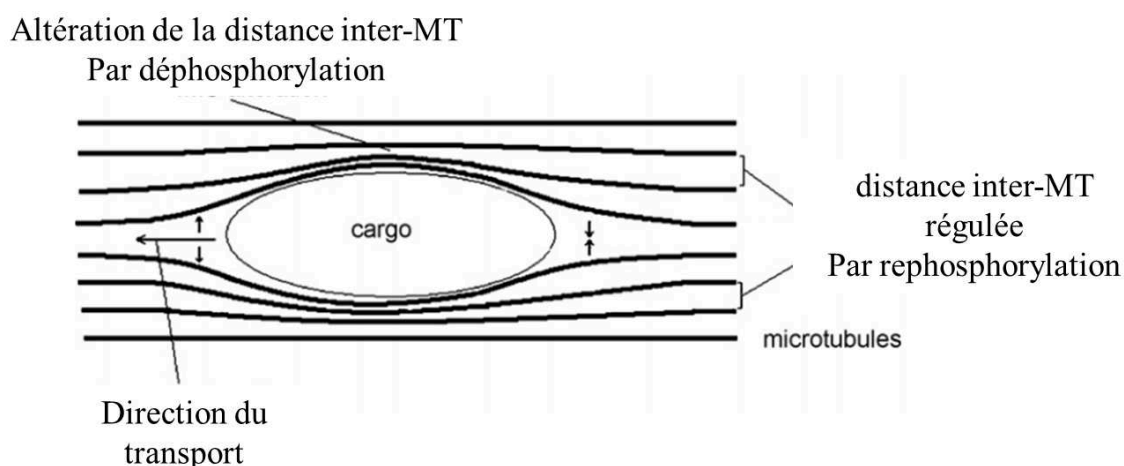
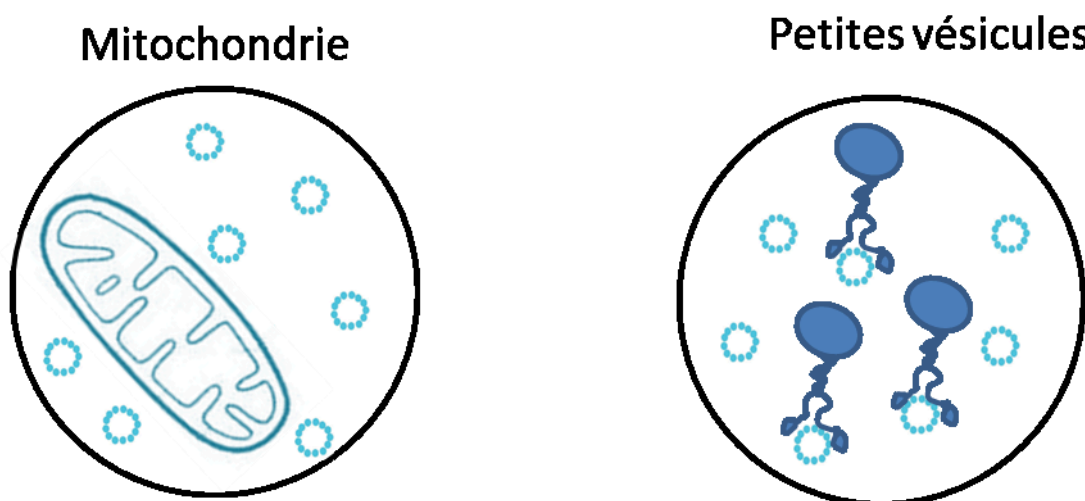


Figure V-19 : Représentation schématique des réarrangements de l'espace interMT nécessaires pour les mouvements des vésicules. Image issue de l'article de Shahpasand, Ahmadian, et Riazi., (2008)³⁰².

Cependant, pour que ce modèle soit applicable *in vivo*, cela nécessiterait qu'une force extérieure soit appliquée aux MTs pour qu'ils se déforment de la sorte sachant que les MTs sont des structures extrêmement rigides (rigidité égale à $7,9 \times 10^{-24} \pm 0,7 \text{ Nm}^2$ et $34 \pm 3 \times 10^{-24} \text{ Nm}^2$ respectivement sans et avec Tau)^{304,305}. Bien qu'il puisse être valable pour les petites vésicules ($\approx 100 \text{ nm}$), ce modèle n'explique pas le passage des mitochondries dont le volume est de $10 \mu\text{m} \times 0,2 \mu\text{m}$ ³⁰⁶. Une autre possibilité présente dans la littérature serait que les MTs se dépolymérisent localement afin de libérer un espace pour le passage de grosses vésicules telles que les mitochondries³⁰⁶. Ainsi, certaines kinésines (ou protéines associées aux kinésines) pourraient moduler l'architecture du réseau microtubulaires, c'est notamment le cas de la kinésine 8 et de MCAK^{307,308}.

Toutefois, les modèles précédemment cités sont basés sur un espacement interMT petit ce qui offre une faible surface pour le passage des mitochondries. D'autant qu'il faut garder à l'esprit que le transport des grosses vésicules est souvent coopératif et que plusieurs moteurs sont impliqués^{298,309,310}. Cela implique des réarrangements locaux durant leurs phases de déplacement ce qui est plus facile à orchestrer lorsque les MTs ne sont pas liés entre eux par des cross-bridges. D'ailleurs, la coopérativité est facilitée lorsque les MTs ne sont pas en fagots, puisque plusieurs vésicules peuvent être transportées en même si les MTs sont séparés (fFigure V-20).



Taille moyenne d'une vésicule commune : 100 nm
Taille moyenne d'une mitochondrie : 10 μm x 0,2 μm

Figure V-20 : Réarrangements locaux des MTs durant une phase de transport actif. Le fait que les MTs ne soient pas liés par des cross-bridges leurs permettent d'être facilement relocalisés dans l'axone.

Du reste, l'observation de coupes axonales transversales par microscopie électronique nous montre qu'en présence de mitochondries, les MTs sont bel et bien séparés (fFigure V-21).

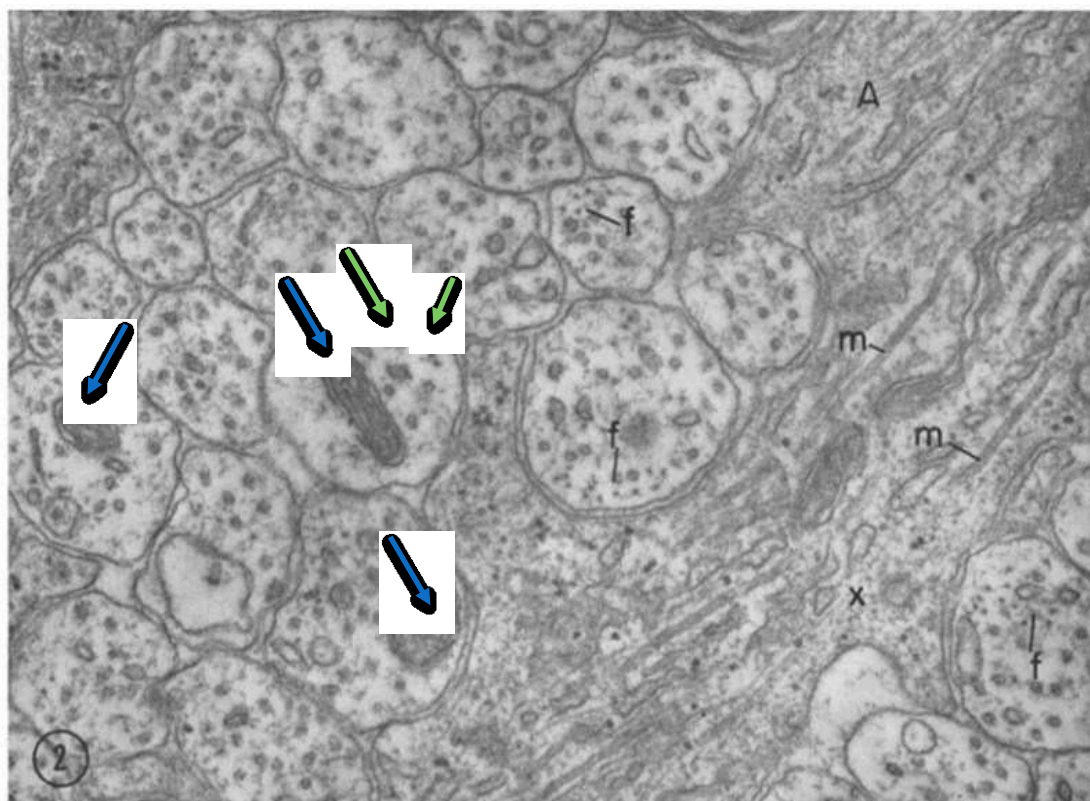


Figure V-21 : Coupe transversale de nerfs optiques de rat prélevés 9 jours après la naissance montrant plusieurs axones (x55,000). A, structure astrocytique f, neurofilaments m, microtubules dans le cytoplasme astrocytique. Dans les axones, trois mitochondries sont indiquées avec des flèches bleues, et deux MTs sont indiqués avec des flèches vertes. Image tirée de l'article de l'article de Peters et Vaughn (1967)¹⁶⁷.

Ainsi, puisque Tau participe aux mécanismes de séparation des MTs, le détachement de la protéine pourrait être lié aux altérations du transport axonal observées lors des Tauopathies³¹¹⁻³¹³, et plus particulièrement, à l'accumulation anormale d'organelles (y compris les mitochondries) au sein d'axones en dégénérescence³¹⁴. Il est d'ailleurs envisageable que ces pathologies soient directement liées à la partie N-terminale, puisque lorsque Tau adopte des conformations qui ne permettent plus la séparation des MTs telles que la conformation du trombone, la protéine deviendrait toxique³¹⁵. Dès lors, cela pourrait expliquer le lien qui a depuis longtemps été établi entre le mauvais repliement de Tau et les pathologies.

Conclusions - Perspectives

De par son implication dans de nombreuses pathologies, Tau est intensivement étudiée depuis plusieurs décennies. Cependant, en dépit de l'étude approfondie de ses fonctions neuronales, très peu de connaissances sont disponibles sur son rôle dans l'architecture axonale. Le domaine de projection de Tau est d'ailleurs au centre d'une controverse. En effet, il existe plusieurs théories divergentes sur sa contribution dans les maladies neurodégénératives et sur son rôle dans la régulation de l'espace interMT.

Dans le modèle le plus communément accepté, la protéine Tau favorise la mise en fagots des MTs en créant des « cross-bridges » à l'interface entre deux MTs. Cependant, ce modèle est basé sur des faits observés dans des cellules où Tau est surexprimée ce qui remet en question sa pertinence dans des conditions physiologiques.

Dans le second modèle, la protéine Tau inhibe la mise en fagots grâce à des forces répulsives à courtes portées en agissant comme un « polymer brush ». Bien que ce modèle puisse être valable localement, il est peu probable qu'il soit prévalent dans les neurones où la concentration de Tau est faible.

Notre travail a consisté à proposer un modèle alternatif à ces deux vues opposées. Nos résultats *in vitro et in cellulo*, combinés à des analyses numériques, nous ont permis de mettre au point un mécanisme où la dimérisation de l'extrémité N-terminale pourrait permettre une séparation efficace des MTs dans les axones. En effet, ce modèle est forgé par le fait que la diffusion de Tau permette à deux N-terminal de se rencontrer, de former un cross-bridge puis de se séparer ce qui empêcherait aux forces d'attractions à courte portée d'avoir lieu et, par conséquent, inhiberait la formation de fagots serrés. Ce mécanisme expliquerait également que Tau soit efficace à de très faibles ratio molaire Tau:Tubuline.

Cependant, à l'issue de ce travail, de nombreux points demandent à être approfondis, notamment le rôle de l'épissage alternatif, afin de mieux comprendre le rôle physiologique de la protéine Tau. En effet, au cours de ce travail, nous avons pu remarquer que le domaine de projection avait un rôle critique dans l'architecture des MTs, cependant nous ne nous sommes pas intéressés aux différences

qui pourraient avoir lieu entre les formes 3R et 4R. Or, il se pourrait que le nombre de répétitions dans le MTBD puisse également jouer un rôle en la matière. En effet, il est connu que les isoformes 4R se lient aux microtubules avec une affinité supérieure. On peut donc imaginer que les isoformes 3R/xN soient moins efficaces que les 4R/xN pour maintenir les MTs écartés. Par ailleurs, s'il existe également une différence des formes 4R par rapport aux formes 3R sur leur capacité à diffuser le long des MTs, cela aurait également une incidence directe sur la distribution spatiale des MTs axonaux.

D'autre part, très peu d'informations sont disponibles sur la plasticité structurale de la protéine Tau, or il est possible qu'elle adopte certaines conformations excluant la possibilité d'un cross-bridge. Il semble donc crucial d'arriver à déterminer le comportement conformationnel de la protéine Tau liée aux MTs pour mieux comprendre son répertoire unique de fonction.

Au-delà de la conformation de la protéine, d'autres facteurs doivent être étudiés tels que les modifications post-traductionnelles et les mutations impliquées dans les maladies neurodégénératives. Il faudrait notamment analyser les conséquences de la phosphorylation dans le domaine de projection sur la distribution spatiale des microtubules axonaux ce qui pourrait éclairer sur le processus conduisant aux dégénérescences axonales.

En effet, à ce jour, il est considéré que l'hyperphosphorylation diminue l'affinité de Tau pour les MTs³¹⁶, ce qui pourrait se traduire par une relocalisation de la protéine dans le compartiment somatodendritique et à terme, à une accumulation d'agrégats de Tau¹⁸⁶. Notre modèle permet d'envisager un mécanisme alternatif. Les événements pathologiques (phosphorylation et mutation), et plus spécifiquement ceux survenant dans le domaine de projection pourrait altérer la capacité de Tau à garder les MTs séparés (Figure VI-1). La mise en fagot serrés des MTs pourrait alors être un des symptômes précoces des Tauopathies, et en particulier de la maladie d'Alzheimer, ce qui se manifesterait par des défauts du transport actif. De récentes simulations numériques vont dans ce sens, en soutenant que l'inversion du gradient de concentration de Tau serait due, au moins partiellement, à une altération du transport axonal^{317,318}. Cette hypothèse nécessite cependant d'être exploré plus en profondeur.

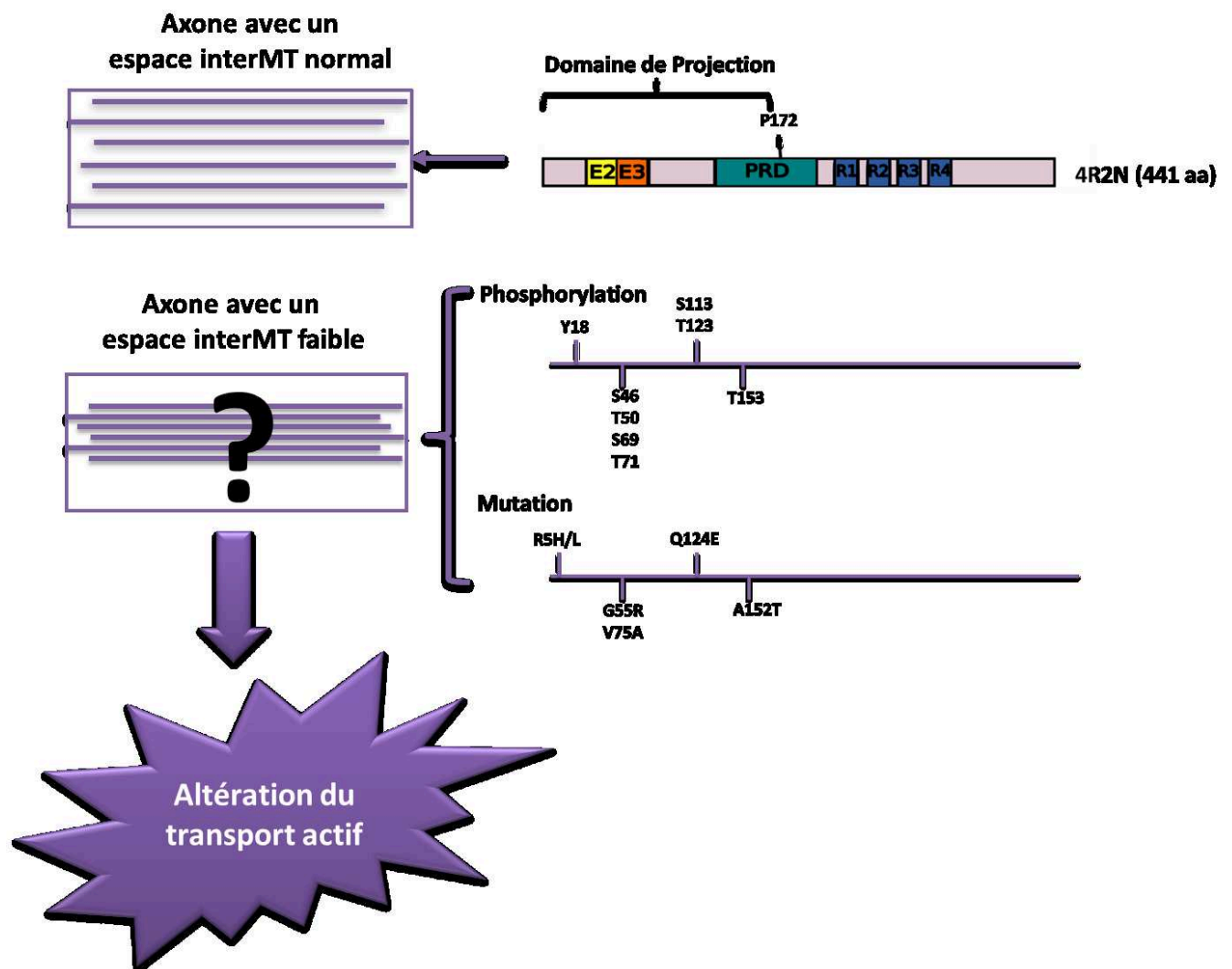


Figure VI-1 : Proposition de mécanisme alternatif aboutissant à la maladie d'Alzheimer.

Références

1. Grundke-Iqbal, I. *et al.* Microtubule-associated protein tau. A component of Alzheimer paired helical filaments. *J. Biol. Chem.* **261**, 6084–6089 (1986).
2. Grundke-Iqbal, I. *et al.* Abnormal phosphorylation of the microtubule-associated protein tau (tau) in Alzheimer cytoskeletal pathology. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* **83**, 4913–4917 (1986).
3. Weingarten, M. D., Lockwood, A. H., Hwo, S. Y. & Kirschner, M. W. A protein factor essential for microtubule assembly. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* **72**, 1858–1862 (1975).
4. Rosenberg, K. J., Ross, J. L., Feinstein, H. E., Feinstein, S. C. & Israelachvili, J. Complementary dimerization of microtubule-associated tau protein: Implications for microtubule bundling and tau-mediated pathogenesis. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* **105**, 7445–7450 (2008).
5. Mandelkow, E. M. & Mandelkow, E. Unstained microtubules studied by cryo-electron microscopy. Substructure, supertwist and disassembly. *J. Mol. Biol.* **181**, 123–135 (1985).
6. Chrétien, D., Metoz, F., Verde, F., Karsenti, E. & Wade, R. H. Lattice defects in microtubules: protofilament numbers vary within individual microtubules. *J. Cell Biol.* **117**, 1031–1040 (1992).
7. Akhmanova, A. & Steinmetz, M. O. Tracking the ends: a dynamic protein network controls the fate of microtubule tips. *Nat. Rev. Mol. Cell Biol.* **9**, 309–322 (2008).
8. Pilhofer, M., Ladinsky, M. S., McDowall, A. W., Petroni, G. & Jensen, G. J. Microtubules in Bacteria : Ancient Tubulins Build a Five-Protofilament Homolog of the Eukaryotic Cytoskeleton. *PLOS Biol.* **9**, e1001213 (2011).
9. Kikkawa, M., Ishikawa, T., Nakata, T., Wakabayashi, T. & Hirokawa, N. Direct visualization of the microtubule lattice seam both in vitro and in vivo. *J. Cell Biol.* **127**, 1965–1971 (1994).
10. Nogales, E., Wolf, S. G. & Downing, K. H. Structure of the $\alpha\beta$ tubulin dimer by electron crystallography. *Nature* **391**, 199–203 (1998).

11. Downing, K. H. & Nogales, E. Tubulin structure: insights into microtubule properties and functions. *Curr. Opin. Struct. Biol.***8**, 785–791 (1998).
12. Downing, K. H. & Nogales, E. Crystallographic structure of tubulin: implications for dynamics and drug binding. *Cell Struct. Funct.***24**, 269–275 (1999).
13. Dustin, P. D. P. in *Microtubules* 267–293 (Springer Berlin Heidelberg, 1984).
14. Ravelli, R. B. G. *et al.* Insight into tubulin regulation from a complex with colchicine and a stathmin-like domain. *Nature***428**, 198–202 (2004).
15. Lefèvre, J. *et al.* The C Terminus of Tubulin, a Versatile Partner for Cationic Molecules. *J. Biol. Chem.***286**, 3065–3078 (2011).
16. Voter, W. A. & Erickson, H. P. The kinetics of microtubule assembly. Evidence for a two-stage nucleation mechanism. *J. Biol. Chem.***259**, 10430–10438 (1984).
17. Bonfils, C., Bec, N., Lacroix, B., Harricane, M.-C. & Larroque, C. Kinetic analysis of tubulin assembly in the presence of the microtubule-associated protein TOGp. *J. Biol. Chem.***282**, 5570–5581 (2007).
18. Linse, K. & Mandelkow, E. M. The GTP-binding peptide of beta-tubulin. Localization by direct photoaffinity labeling and comparison with nucleotide-binding proteins. *J. Biol. Chem.***263**, 15205–15210 (1988).
19. Walker, R. A. *et al.* Dynamic instability of individual microtubules analyzed by video light microscopy: rate constants and transition frequencies. *J. Cell Biol.***107**, 1437–1448 (1988).
20. H P Erickson & O'Brien, and E. T. Microtubule Dynamic Instability and GTP Hydrolysis. *Annu. Rev. Biophys. Biomol. Struct.***21**, 145–166 (1992).
21. Mitchison, T. & Kirschner, M. Dynamic instability of microtubule growth. *Nature***312**, 237–242 (1984).

22. Grover, S. & Hamel, E. The magnesium-GTP interaction in microtubule assembly. *Eur. J. Biochem. FEBS***222**, 163–172 (1994).
23. Melki, R., Carlier, M. F., Pantaloni, D. & Timasheff, S. N. Cold depolymerization of microtubules to double rings: geometric stabilization of assemblies. *Biochemistry (Mosc.)***28**, 9143–9152 (1989).
24. Mandelkow, E. M., Mandelkow, E. & Milligan, R. A. Microtubule dynamics and microtubule caps: a time-resolved cryo-electron microscopy study. *J. Cell Biol.***114**, 977–991 (1991).
25. Nogales, E. & Wang, H.-W. Structural intermediates in microtubule assembly and disassembly: how and why? *Curr. Opin. Cell Biol.***18**, 179–184 (2006).
26. Jánosi, I. M., Chrétien, D. & Flyvbjerg, H. Modeling elastic properties of microtubule tips and walls. *Eur. Biophys. J. EBJ***27**, 501–513 (1998).
27. Jánosi, I. M., Chrétien, D. & Flyvbjerg, H. Structural microtubule cap: stability, catastrophe, rescue, and third state. *Biophys. J.***83**, 1317–1330 (2002).
28. Caplow, M., Ruhlen, R. L. & Shanks, J. The free energy for hydrolysis of a microtubule-bound nucleotide triphosphate is near zero: all of the free energy for hydrolysis is stored in the microtubule lattice. *J. Cell Biol.***127**, 779–788 (1994).
29. Hamon, L., Savarin, P., Curmi, P. A. & Pastré, D. Rapid assembly and collective behavior of microtubule bundles in the presence of polyamines. *Biophys. J.***101**, 205–216 (2011).
30. Jordan, M. A. & Wilson, L. Use of drugs to study role of microtubule assembly dynamics in living cells. *Methods Enzymol.***298**, 252–276 (1998).
31. Kinoshita, K., Arnal, I., Desai, A., Drechsel, D. N. & Hyman, A. A. Reconstitution of physiological microtubule dynamics using purified components. *Science***294**, 1340–1343 (2001).
32. Gard, D. L. & Kirschner, M. W. Microtubule assembly in cytoplasmic extracts of *Xenopus* oocytes and eggs. *J. Cell Biol.***105**, 2191–2201 (1987).

33. Walczak, C. E., Mitchison, T. J. & Desai, A. XKCM1: a *Xenopus* kinesin-related protein that regulates microtubule dynamics during mitotic spindle assembly. *Cell***84**, 37–47 (1996).
34. Curmi, P. A. *et al.* Stathmin and its phosphoprotein family: general properties, biochemical and functional interaction with tubulin. *Cell Struct. Funct.***24**, 345–357 (1999).
35. Kinoshita, K., Habermann, B. & Hyman, A. A. XMAP215: a key component of the dynamic microtubule cytoskeleton. *Trends Cell Biol.***12**, 267–273 (2002).
36. Rivas, G., Ferrone, F. & Herzfeld, J. Life in a crowded world. *EMBO Rep.***5**, 23–27 (2004).
37. Berg, B. van den, Ellis, R. J. & Dobson, C. M. Effects of macromolecular crowding on protein folding and aggregation. *EMBO J.***18**, 6927–6933 (1999).
38. Zimmerman, S. B. & Trach, S. O. Estimation of macromolecule concentrations and excluded volume effects for the cytoplasm of *Escherichia coli*. *J. Mol. Biol.***222**, 599–620 (1991).
39. Ellis, R. J. & Minton, A. P. Cell biology: Join the crowd. *Nature***425**, 27–28 (2003).
40. Minton, A. P. Influence of excluded volume upon macromolecular structure and associations in ‘crowded’ media. *Curr. Opin. Biotechnol.***8**, 65–69 (1997).
41. Asakura, S. & Oosawa, F. On Interaction between Two Bodies Immersed in a Solution of Macromolecules. *J. Chem. Phys.***22**, 1255–1256 (1954).
42. Asakura, S. & Oosawa, F. Interaction between particles suspended in solutions of macromolecules. *J. Polym. Sci.***33**, 183–192 (1958).
43. Zhou, H.-X., Rivas, G. & Minton, A. P. Macromolecular crowding and confinement: biochemical, biophysical, and potential physiological consequences. *Annu. Rev. Biophys.***37**, 375–397 (2008).
44. Bounedjah, O. *et al.* Macromolecular Crowding Regulates Assembly of mRNA Stress Granules after Osmotic Stress NEW ROLE FOR COMPATIBLE OSMOLYTES. *J. Biol. Chem.***287**, 2446–2458 (2012).

45. Dix, J. A. & Verkman, A. S. Crowding effects on diffusion in solutions and cells. *Annu. Rev. Biophys.***37**, 247–263 (2008).
46. Luby-Phelps, K. Cytoarchitecture and physical properties of cytoplasm: volume, viscosity, diffusion, intracellular surface area. *Int. Rev. Cytol.***192**, 189–221 (2000).
47. Needleman, D. J. *et al.* Radial compression of microtubules and the mechanism of action of taxol and associated proteins. *Biophys. J.***89**, 3410–3423 (2005).
48. Zhao, H., Magone, M. T. & Schuck, P. The role of macromolecular crowding in the evolution of lens crystallins with high molecular refractive index. *Phys. Biol.***8**, 46004 (2011).
49. Turner, P. F. & Margolis, R. L. Taxol-induced bundling of brain-derived microtubules. *J. Cell Biol.***99**, 940–946 (1984).
50. Garner, M. M. & Burg, M. B. Macromolecular crowding and confinement in cells exposed to hypertonicity. *Am. J. Physiol.***266**, C877-892 (1994).
51. Nunes, P. *et al.* Ionic imbalance, in addition to molecular crowding, abates cytoskeletal dynamics and vesicle motility during hypertonic stress. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.***112**, E3104-3113 (2015).
52. Burton, P. R. & Paige, J. L. Polarity of axoplasmic microtubules in the olfactory nerve of the frog. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.***78**, 3269–3273 (1981).
53. Heidemann, S. R., Landers, J. M. & Hamborg, M. A. Polarity orientation of axonal microtubules. *J. Cell Biol.***91**, 661–665 (1981).
54. Bray, D. & Bunge, M. B. Serial analysis of microtubules in cultured rat sensory axons. *J. Neurocytol.***10**, 589–605 (1981).
55. Yu, W. & Baas, P. W. Changes in microtubule number and length during axon differentiation. *J. Neurosci. Off. J. Soc. Neurosci.***14**, 2818–2829 (1994).

56. Letourneau, P. C. Analysis of microtubule number and length in cytoskeletons of cultured chick sensory neurons. *J. Neurosci. Off. J. Soc. Neurosci.***2**, 806–814 (1982).
57. Tsukita, S., Usukura, J., Tsukita, S. & Ishikawa, H. The cytoskeleton in myelinated axons: a freeze-etch replica study. *Neuroscience***7**, 2135–2147 (1982).
58. Seitz-Tutter, D., Langford, G. M. & Weiss, D. G. Dynamic instability of native microtubules from squid axons is rare and independent of gliding and vesicle transport. *Exp. Cell Res.***178**, 504–512 (1988).
59. Weiss, D. G., Langford, G. M., Seitz-Tutter, D. & Keller, F. Dynamic instability and motile events of native microtubules from squid axoplasm. *Cell Motil. Cytoskeleton***10**, 285–295 (1988).
60. Lim, S. S., Sammak, P. J. & Borisy, G. G. Progressive and spatially differentiated stability of microtubules in developing neuronal cells. *J. Cell Biol.***109**, 253–263 (1989).
61. Lyser, K. M. EARLY DIFFERENTIATION OF MOTOR NEUROBLASTS IN THE CHICK EMBRYO AS STUDIED BY ELECTRON MICROSCOPY. I. GENERAL ASPECTS. *Dev. Biol.***10**, 433–466 (1964).
62. Tennyson, V. M. Electron microscopic study of the developing neuroblast of the dorsal root ganglion of the rabbit embryo. *J. Comp. Neurol.***124**, 267–317 (1965).
63. Lyser, K. M. Early differentiation of motor neuroblasts in the chick embryo as studied by electron microscopy. II. Microtubules and neurofilaments. *Dev. Biol.***17**, 117–142 (1968).
64. Li, Y. & Black, M. M. Microtubule assembly and turnover in growing axons. *J. Neurosci.***16**, 531–544 (1996).
65. Brown, A., Li, Y., Slaughter, T. & Black, M. Composite Microtubules of the Axon - Quantitative-Analysis of Tyrosinated and Acetylated Tubulin Along Individual Axonal Microtubules. *J. Cell Sci.***104**, 339–352 (1993).
66. Baas, P. W., Rao, A. N., Matamoros, A. J. & Leo, L. Stability properties of neuronal microtubules. *Cytoskelet. Hoboken NJ* (2016). doi:10.1002/cm.21286

67. Akhmanova, A. & Hoogenraad, C. C. Microtubule minus-end-targeting proteins. *Curr. Biol.* **CB25**, R162-171 (2015).
68. Jiang, Y.-Z. *et al.* Enriched variations in TEKT4 and breast cancer resistance to paclitaxel. *Nat. Commun.* **5**, 3802 (2014).
69. Yau, K. W. *et al.* Microtubule minus-end binding protein CAMSAP2 controls axon specification and dendrite development. *Neuron* **82**, 1058–1073 (2014).
70. Roll-Mecak, A. & McNally, F. J. Microtubule-severing enzymes. *Curr. Opin. Cell Biol.* **22**, 96–103 (2010).
71. Roll-Mecak, A. & Vale, R. D. Making more microtubules by severing: a common theme of noncentrosomal microtubule arrays? *J. Cell Biol.* **175**, 849–851 (2006).
72. Lacroix, B. *et al.* Tubulin polyglutamylation stimulates spastin-mediated microtubule severing. *J. Cell Biol.* **189**, 945–954 (2010).
73. Sudo, H. & Baas, P. W. Acetylation of microtubules influences their sensitivity to severing by katanin in neurons and fibroblasts. *J. Neurosci. Off. J. Soc. Neurosci.* **30**, 7215–7226 (2010).
74. Sauter, S. *et al.* Mutation analysis of the spastin gene (SPG4) in patients in Germany with autosomal dominant hereditary spastic paraplegia. *Hum. Mutat.* **20**, 127–132 (2002).
75. Tarrade, A. *et al.* A mutation of spastin is responsible for swellings and impairment of transport in a region of axon characterized by changes in microtubule composition. *Hum. Mol. Genet.* **15**, 3544–3558 (2006).
76. Baas, P. W. Microtubule Stability in the Axon: New Answers to an Old Mystery. *Neuron* **78**, 3–5 (2013).
77. Brady, S. T., Tytell, M. & Lasek, R. J. Axonal tubulin and axonal microtubules: biochemical evidence for cold stability. *J. Cell Biol.* **99**, 1716–1724 (1984).

78. Song, Y. *et al.* Transglutaminase and Polyamination of Tubulin: Posttranslational Modification for Stabilizing Axonal Microtubules. *Neuron***78**, 109–123 (2013).
79. Verhey, K. J. & Gaertig, J. The tubulin code. *Cell Cycle Georget. Tex***6**, 2152–2160 (2007).
80. Janke, C. & Bulinski, J. C. Post-translational regulation of the microtubule cytoskeleton: mechanisms and functions. *Nat. Rev. Mol. Cell Biol.***12**, 773–786 (2011).
81. Wehenkel, A. & Janke, C. Towards elucidating the tubulin code. *Nat. Cell Biol.***16**, 303–305 (2014).
82. Hammond, J. W., Cai, D. & Verhey, K. J. Tubulin modifications and their cellular functions. *Curr. Opin. Cell Biol.***20**, 71–76 (2008).
83. Westermann, S. & Weber, K. Post-translational modifications regulate microtubule function. *Nat. Rev. Mol. Cell Biol.***4**, 938–948 (2003).
84. Lafanechère, L. & Job, D. The Third Tubulin Pool. *Neurochem. Res.***25**, 11–18 (2000).
85. Fourest-Lieuvin, A. *et al.* Microtubule Regulation in Mitosis: Tubulin Phosphorylation by the Cyclin-dependent Kinase Cdk1. *Mol. Biol. Cell***17**, 1041–1050 (2006).
86. Namba, T. *et al.* Extracellular and Intracellular Signaling for Neuronal Polarity. *Physiol. Rev.***95**, 995–1024 (2015).
87. Garnham, C. P. & Roll-Mecak, A. The chemical complexity of cellular microtubules: Tubulin post-translational modification enzymes and their roles in tuning microtubule functions. *Cytoskeleton***69**, 442–463 (2012).
88. Song, Y. & Brady, S. T. Posttranslational Modifications of Tubulin: Pathways to Functional Diversity of Microtubules. *Trends Cell Biol.***25**, 125–136 (2015).
89. Kim, H., Binder, L. I. & Rosenbaum, J. L. The periodic association of MAP2 with brain microtubules in vitro. *J. Cell Biol.***80**, 266–276 (1979).

90. Chin, S. S. M. & Goldman, J. E. Glial inclusions in CNS degenerative diseases. *J. Neuropathol. Exp. Neurol.***55**, 499–508 (1996).
91. Arrasate, M., Perez, M., Valpuesta, J. M. & Avila, J. Role of glycosaminoglycans in determining the helicity of paired helical filaments. *Am. J. Pathol.***151**, 1115–1122 (1997).
92. Arrasate, M., Pérez, M. & Avila, J. Tau Dephosphorylation at Tau-1 Site Correlates with its Association to Cell Membrane. *Neurochem. Res.***25**, 43–50 (2000).
93. Avila, J., Lim, F., Moreno, F., Belmonte, C. & Cuello, A. C. Tau function and dysfunction in neurons: its role in neurodegenerative disorders. *Mol. Neurobiol.***25**, 213–231 (2002).
94. Rady, R. M., Zinkowski, R. P. & Binder, L. I. Presence of tau in isolated nuclei from human brain. *Neurobiol. Aging***16**, 479–486 (1995).
95. Greenwood, J. A. & Johnson, G. V. W. Localization and in Situ Phosphorylation State of Nuclear Tau. *Exp. Cell Res.***220**, 332–337 (1995).
96. Loomis, P. A., Howard, T. H., Castleberry, R. P. & Binder, L. I. Identification of nuclear tau isoforms in human neuroblastoma cells. *Proc. Natl. Acad. Sci.***87**, 8422–8426 (1990).
97. Sündermann, F., Fernandez, M.-P. & Morgan, R. O. An evolutionary roadmap to the microtubule-associated protein MAP Tau. *BMC Genomics***17**, (2016).
98. Dehmelt, L. & Halpain, S. The MAP2/Tau family of microtubule-associated proteins. *Genome Biol.***6**, 204 (2005).
99. Lewis, S. A., Wang, D. H. & Cowan, N. J. Microtubule-associated protein MAP2 shares a microtubule binding motif with tau protein. *Science***242**, 936–939 (1988).
100. Goedert, M. *et al.* PTL-1, a microtubule-associated protein with tau-like repeats from the nematode *Caenorhabditis elegans*. *J. Cell Sci.***109**, 2661–2672 (1996).
101. Irminger-Finger, I., Laymon, R. A. & Goldstein, L. S. Analysis of the primary sequence and microtubule-binding region of the *Drosophila* 205K MAP. *J. Cell Biol.***111**, 2563–2572 (1990).

102. Li, Y. J. & Low, W. C. Intra-retrosplenial cortical grafts of cholinergic neurons: functional incorporation and restoration of high affinity choline uptake. *Neurochem. Res.***22**, 589–595 (1997).
103. Yin, H. S., Chou, H. C. & Chiu, M. M. Changes in the microtubule proteins in the developing and transected spinal cords of the bullfrog tadpole: Induction of microtubule-associated protein 2c and enhanced levels of Tau and tubulin in regenerating central axons. *Neuroscience***67**, 763–775 (1995).
104. Andreadis, A. Tau Splicing and the Intricacies of Dementia. *J. Cell. Physiol.***227**, 1220–1225 (2012).
105. Kalcheva, N. *et al.* Genomic structure of human microtubule-associated protein 2 (MAP-2) and characterization of additional MAP-2 isoforms. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.***92**, 10894–10898 (1995).
106. Himmler, A. Structure of the bovine tau gene: alternatively spliced transcripts generate a protein family. *Mol. Cell. Biol.***9**, 1389–1396 (1989).
107. Goedert, M., Wischik, C. M., Crowther, R. A., Walker, J. E. & Klug, A. Cloning and sequencing of the cDNA encoding a core protein of the paired helical filament of Alzheimer disease: identification as the microtubule-associated protein tau. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.***85**, 4051–4055 (1988).
108. Goedert, M., Spillantini, M. G., Jakes, R., Rutherford, D. & Crowther, R. A. Multiple isoforms of human microtubule-associated protein tau: sequences and localization in neurofibrillary tangles of Alzheimer's disease. *Neuron***3**, 519–526 (1989).
109. Goedert, M. & Jakes, R. Expression of separate isoforms of human tau protein: correlation with the tau pattern in brain and effects on tubulin polymerization. *EMBO J.***9**, 4225–4230 (1990).
110. Lee, G. & Leurgers, C. J. Tau and Tauopathies. *Prog. Mol. Biol. Transl. Sci.***107**, 263–293 (2012).

111. Georgieff, I. S. *et al.* Expression of high molecular weight tau in the central and peripheral nervous systems. *J. Cell Sci.***105 (Pt 3)**, 729–737 (1993).
112. Couchie, D. *et al.* Primary structure of high molecular weight tau present in the peripheral nervous system. *Proc. Natl. Acad. Sci.***89**, 4378–4381 (1992).
113. Goedert, M., Spillantini, M. G. & Crowther, R. A. Cloning of a big tau microtubule-associated protein characteristic of the peripheral nervous system. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.***89**, 1983–1987 (1992).
114. Goode, B. L., Chau, M., Denis, P. E. & Feinstein, S. C. Structural and Functional Differences between 3-Repeat and 4-Repeat Tau Isoforms IMPLICATIONS FOR NORMAL TAU FUNCTION AND THE ONSET OF NEURODEGENERATIVE DISEASE. *J. Biol. Chem.***275**, 38182–38189 (2000).
115. Gustke, N., Trinczek, B., Biernat, J., Mandelkow, E.-M. & Mandelkow, E. Domains of tau Protein and Interactions with Microtubules. *Biochemistry (Mosc.)***33**, 9511–9522 (1994).
116. Hirokawa, N., Shiomura, Y. & Okabe, S. Tau proteins: the molecular structure and mode of binding on microtubules. *J. Cell Biol.***107**, 1449–1459 (1988).
117. Neve, R. L., Harris, P., Kosik, K. S., Kurnit, D. M. & Donlon, T. A. Identification of cDNA clones for the human microtubule-associated protein tau and chromosomal localization of the genes for tau and microtubule-associated protein 2. *Brain Res.***387**, 271–280 (1986).
118. LoPresti, P., Szuchet, S., Papasozomenos, S. C., Zinkowski, R. P. & Binder, L. I. Functional implications for the microtubule-associated protein tau: localization in oligodendrocytes. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.***92**, 10369–10373 (1995).
119. Müller, R., Heinrich, M., Heck, S., Blohm, D. & Richter-Landsberg, C. Expression of microtubule-associated proteins MAP2 and tau in cultured rat brain oligodendrocytes. *Cell Tissue Res.***288**, 239–249 (1997).

120. Klein, C. *et al.* Process outgrowth of oligodendrocytes is promoted by interaction of fyn kinase with the cytoskeletal protein tau. *J. Neurosci. Off. J. Soc. Neurosci.***22**, 698–707 (2002).
121. Gu, Y., Oyama, F. & Ihara, Y. Tau is widely expressed in rat tissues. *J. Neurochem.***67**, 1235–1244 (1996).
122. Spillantini, M. G. *et al.* Mutation in the tau gene in familial multiple system tauopathy with presenile dementia. *Proc. Natl. Acad. Sci.***95**, 7737–7741 (1998).
123. Hutton, M. *et al.* Association of missense and 5'-splice-site mutations in tau with the inherited dementia FTDP-17. *Nature***393**, 702–705 (1998).
124. Clark, L. N. *et al.* Pathogenic implications of mutations in the tau gene in pallido-ponto-nigral degeneration and related neurodegenerative disorders linked to chromosome 17. *Proc. Natl. Acad. Sci.***95**, 13103–13107 (1998).
125. Caillet-Boudin, M.-L., Buée, L., Sergeant, N. & Lefebvre, B. Regulation of human MAPT gene expression. *Mol. Neurodegener.***10**, (2015).
126. Trinczek, B., Biernat, J., Baumann, K., Mandelkow, E. M. & Mandelkow, E. Domains of tau protein, differential phosphorylation, and dynamic instability of microtubules. *Mol. Biol. Cell***6**, 1887–1902 (1995).
127. Goode, B. L. *et al.* Functional interactions between the proline-rich and repeat regions of tau enhance microtubule binding and assembly. *Mol. Biol. Cell***8**, 353–365 (1997).
128. Šimić, G. *et al.* Tau Protein Hyperphosphorylation and Aggregation in Alzheimer's Disease and Other Tauopathies, and Possible Neuroprotective Strategies. *Biomolecules***6**, (2016).
129. Ding, H., Dolan, P. J. & Johnson, G. V. W. Histone deacetylase 6 interacts with the microtubule-associated protein tau. *J. Neurochem.***106**, 2119–2130 (2008).
130. Huang, D. Y. *et al.* ApoE3 binding to tau tandem repeat I is abolished by tau serine262 phosphorylation. *Neurosci. Lett.***192**, 209–212 (1995).

131. Bergen, M. von *et al.* Assembly of τ protein into Alzheimer paired helical filaments depends on a local sequence motif (306VQIVYK311) forming β structure. *Proc. Natl. Acad. Sci.***97**, 5129–5134 (2000).
132. von Bergen, M., Barghorn, S., Biernat, J., Mandelkow, E.-M. & Mandelkow, E. Tau aggregation is driven by a transition from random coil to beta sheet structure. *Biochim. Biophys. Acta***1739**, 158–166 (2005).
133. Morris, M., Maeda, S., Vossel, K. & Mucke, L. The Many Faces of Tau. *Neuron***70**, 410–426 (2011).
134. Himmelstein, D. S., Ward, S. M., Lancia, J. K., Patterson, K. R. & Binder, L. I. Tau as a therapeutic target in neurodegenerative disease. *Pharmacol. Ther.***136**, 8–22 (2012).
135. Reynolds, C. H. *et al.* Phosphorylation regulates tau interactions with Src homology 3 domains of phosphatidylinositol 3-kinase, phospholipase C γ 1, Grb2, and Src family kinases. *J. Biol. Chem.***283**, 18177–18186 (2008).
136. King, M. E. *et al.* Tau-dependent microtubule disassembly initiated by prefibrillar beta-amyloid. *J. Cell Biol.***175**, 541–546 (2006).
137. Kempf, M., Clement, A., Faissner, A., Lee, G. & Brandt, R. Tau binds to the distal axon early in development of polarity in a microtubule- and microfilament-dependent manner. *J. Neurosci. Off. J. Soc. Neurosci.***16**, 5583–5592 (1996).
138. Dotti, C. G., Banker, G. A. & Binder, L. I. The expression and distribution of the microtubule-associated proteins tau and microtubule-associated protein 2 in hippocampal neurons in the rat in situ and in cell culture. *Neuroscience***23**, 121–130 (1987).
139. Mandell, J. W. & Banker, G. A. A spatial gradient of tau protein phosphorylation in nascent axons. *J. Neurosci. Off. J. Soc. Neurosci.***16**, 5727–5740 (1996).

140. Fanara, P. *et al.* Changes in microtubule turnover accompany synaptic plasticity and memory formation in response to contextual fear conditioning in mice. *Neuroscience***168**, 167–178 (2010).
141. Qiang, L., Yu, W., Andreadis, A., Luo, M. & Baas, P. W. Tau protects microtubules in the axon from severing by katanin. *J. Neurosci. Off. J. Soc. Neurosci.***26**, 3120–3129 (2006).
142. Takei, Y., Teng, J., Harada, A. & Hirokawa, N. Defects in axonal elongation and neuronal migration in mice with disrupted tau and map1b genes. *J. Cell Biol.***150**, 989–1000 (2000).
143. Shaw-Smith, C. *et al.* Microdeletion encompassing MAPT at chromosome 17q21.3 is associated with developmental delay and learning disability. *Nat. Genet.***38**, 1032–1037 (2006).
144. Dubourg, C. *et al.* Clinical and molecular characterization of 17q21.31 microdeletion syndrome in 14 French patients with mental retardation. *Eur. J. Med. Genet.***54**, 144–151 (2011).
145. Kosik, K. S. & Caceres, A. Tau protein and the establishment of an axonal morphology. *J. Cell Sci. Suppl.***15**, 69–74 (1991).
146. Knops, J. *et al.* Overexpression of tau in a nonneuronal cell induces long cellular processes. *J. Cell Biol.***114**, 725–733 (1991).
147. Chen, J., Kanai, Y., Cowan, N. J. & Hirokawa, N. Projection domains of MAP2 and tau determine spacings between microtubules in dendrites and axons. *Nature***360**, 674–677 (1992).
148. Dawson, H. N. *et al.* Inhibition of neuronal maturation in primary hippocampal neurons from tau deficient mice. *J. Cell Sci.***114**, 1179–1187 (2001).
149. Harada, A. *et al.* Altered microtubule organization in small-calibre axons of mice lacking tau protein. *Nature***369**, 488–491 (1994).
150. Bell, K. F. S. & Claudio Cuello, A. Altered synaptic function in Alzheimer's disease. *Eur. J. Pharmacol.***545**, 11–21 (2006).
151. Yoshiyama, Y. *et al.* Synapse loss and microglial activation precede tangles in a P301S tauopathy mouse model. *Neuron***53**, 337–351 (2007).

152. Morfini, G., Pigino, G., Beffert, U., Busciglio, J. & Brady, S. T. Fast axonal transport misregulation and Alzheimer's disease. *Neuromolecular Med.***2**, 89–99 (2002).
153. Zempel, H. & Mandelkow, E.-M. Tau missorting and spastin-induced microtubule disruption in neurodegeneration: Alzheimer Disease and Hereditary Spastic Paraplegia. *Mol. Neurodegener.***10**, (2015).
154. Vossel, K. A. *et al.* Tau reduction prevents Abeta-induced defects in axonal transport. *Science***330**, 198 (2010).
155. Yuan, A., Kumar, A., Peterhoff, C., Duff, K. & Nixon, R. A. Axonal transport rates in vivo are unaffected by tau deletion or overexpression in mice. *J. Neurosci. Off. J. Soc. Neurosci.***28**, 1682–1687 (2008).
156. Ebner, A. *et al.* Overexpression of Tau Protein Inhibits Kinesin-dependent Trafficking of Vesicles, Mitochondria, and Endoplasmic Reticulum: Implications for Alzheimer's Disease. *J. Cell Biol.***143**, 777–794 (1998).
157. Seitz, A. *et al.* Single-molecule investigation of the interference between kinesin, tau and MAP2c. *EMBO J.***21**, 4896–4905 (2002).
158. Vershinin, M., Carter, B. C., Razafsky, D. S., King, S. J. & Gross, S. P. Multiple-motor based transport and its regulation by Tau. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.***104**, 87–92 (2007).
159. Brandt, R. & Lee, G. Functional organization of microtubule-associated protein tau. Identification of regions which affect microtubule growth, nucleation, and bundle formation in vitro. *J. Biol. Chem.***268**, 3414–3419 (1993).
160. Brandt, R. & Lee, G. Orientation, assembly, and stability of microtubule bundles induced by a fragment of tau protein. *Cell Motil. Cytoskeleton***28**, 143–154 (1994).
161. Brandt, R., Léger, J. & Lee, G. Interaction of tau with the neural plasma membrane mediated by tau's amino-terminal projection domain. *J. Cell Biol.***131**, 1327–1340 (1995).

162. Frappier, T. F., Georgieff, I. S., Brown, K. & Shelanski, M. L. τ Regulation of Microtubule-Microtubule Spacing and Bundling. *J. Neurochem.***63**, 2288–2294 (1994).
163. Black, M. M. Comparison of the effects of microtubule-associated protein 2 and tau on the packing density of in vitro assembled microtubules. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.***84**, 7783–7787 (1987).
164. Baas, P. W., Pienkowski, T. P. & Kosik, K. S. Processes induced by tau expression in Sf9 cells have an axon-like microtubule organization. *J. Cell Biol.***115**, 1333–1344 (1991).
165. Kanai, Y., Chen, J. & Hirokawa, N. Microtubule bundling by tau proteins in vivo: analysis of functional domains. *EMBO J.***11**, 3953–3961 (1992).
166. Kanai, Y. *et al.* Expression of multiple tau isoforms and microtubule bundle formation in fibroblasts transfected with a single tau cDNA. *J. Cell Biol.***109**, 1173–1184 (1989).
167. Peters, A. & Vaughn, J. E. Microtubules and Filaments in the Axons and Astrocytes of Early Postnatal Rat Optic Nerves. *J. Cell Biol.***32**, 113–119 (1967).
168. Yamada, K. M., Spooner, B. S. & Wessells, N. K. Ultrastructure and function of growth cones and axons of cultured nerve cells. *J. Cell Biol.***49**, 614–635 (1971).
169. Schulz, A. *et al.* Merlin isoform 2 in neurofibromatosis type 2-associated polyneuropathy. *Nat. Neurosci.***16**, 426–433 (2013).
170. Quraisha, S., Cowan, C. M. & Mudher, A. NAP (davunetide) rescues neuronal dysfunction in a Drosophila model of tauopathy. *Mol. Psychiatry***18**, 834–842 (2013).
171. Stephan, R. *et al.* Hierarchical microtubule organization controls axon caliber and transport and determines synaptic structure and stability. *Dev. Cell***33**, 5–21 (2015).
172. Palay, S. L., Sotelo, C., Peters, A. & Orkand, P. M. The axon hillock and the initial segment. *J. Cell Biol.***38**, 193–201 (1968).

173. Mukhopadhyay, R. & Hoh, J. H. AFM force measurements on microtubule-associated proteins: the projection domain exerts a long-range repulsive force. *FEBS Lett.***505**, 374–378 (2001).
174. Mukhopadhyay, R., Kumar, S. & Hoh, J. H. Molecular mechanisms for organizing the neuronal cytoskeleton. *BioEssays***26**, 1017–1025 (2004).
175. Brittain, W. J. & Minko, S. A structural definition of polymer brushes. *J. Polym. Sci. Part Polym. Chem.***45**, 3505–3512 (2007).
176. Hinrichs, M. H. *et al.* Tau Protein Diffuses along the Microtubule Lattice. *J. Biol. Chem.***287**, 38559–38568 (2012).
177. Cooper, J. R. & Wordeman, L. The diffusive interaction of microtubule binding proteins. *Curr. Opin. Cell Biol.***21**, 68–73 (2009).
178. Binder, L. I., Frankfurter, A. & Rebhun, L. I. The distribution of tau in the mammalian central nervous system. *J. Cell Biol.***101**, 1371–1378 (1985).
179. Drubin, D. G., Feinstein, S. C., Shooter, E. M. & Kirschner, M. W. Nerve growth factor-induced neurite outgrowth in PC12 cells involves the coordinate induction of microtubule assembly and assembly-promoting factors. *J. Cell Biol.***101**, 1799–1807 (1985).
180. Khatoon, S., Grundke-Iqbal, I. & Iqbal, K. Brain Levels of Microtubule-Associated Protein τ Are Elevated in Alzheimer's Disease: A Radioimmuno-Slot-Blot Assay for Nanograms of the Protein. *J. Neurochem.***59**, 750–753 (1992).
181. Hiller, G. & Weber, K. Radioimmunoassay for tubulin: a quantitative comparison of the tubulin content of different established tissue culture cells and tissues. *Cell***14**, 795–804 (1978).
182. Grundke-Iqbal, I. *et al.* Abnormal phosphorylation of the microtubule-associated protein tau (τ) in Alzheimer cytoskeletal pathology. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.***83**, 4913–4917 (1986).

183. Baudier, J., Lee, S. H. & Cole, R. D. Separation of the different microtubule-associated tau protein species from bovine brain and their mode II phosphorylation by Ca²⁺/phospholipid-dependent protein kinase C. *J. Biol. Chem.* **262**, 17584–17590 (1987).
184. Williamson, R. *et al.* Rapid Tyrosine Phosphorylation of Neuronal Proteins Including Tau and Focal Adhesion Kinase in Response to Amyloid- β Peptide Exposure: Involvement of Src Family Protein Kinases. *J. Neurosci.* **22**, 10–20 (2002).
185. Lee, G. *et al.* Phosphorylation of tau by fyn: implications for Alzheimer's disease. *J. Neurosci. Off. J. Soc. Neurosci.* **24**, 2304–2312 (2004).
186. Noble, W., Hanger, D. P., Miller, C. C. J. & Lovestone, S. The Importance of Tau Phosphorylation for Neurodegenerative Diseases. *Front. Neurol.* **4**, (2013).
187. Hernandez, P., Lee, G., Sjoberg, M. & Maccioni, R. B. Tau phosphorylation by cdk5 and Fyn in response to amyloid peptide Abeta (25-35): involvement of lipid rafts. *J. Alzheimers Dis. JAD* **16**, 149–156 (2009).
188. Mairet-Coello, G. *et al.* The CAMKK2-AMPK kinase pathway mediates the synaptotoxic effects of A β oligomers through Tau phosphorylation. *Neuron* **78**, 94–108 (2013).
189. Thornton, C., Bright, N. J., Sastre, M., Muckett, P. J. & Carling, D. AMP-activated protein kinase (AMPK) is a tau kinase, activated in response to amyloid β -peptide exposure. *Biochem. J.* **434**, 503–512 (2011).
190. Hanger, D. P. *et al.* Novel phosphorylation sites in tau from Alzheimer brain support a role for casein kinase 1 in disease pathogenesis. *J. Biol. Chem.* **282**, 23645–23654 (2007).
191. Litersky, J. M. *et al.* Tau protein is phosphorylated by cyclic AMP-dependent protein kinase and calcium/calmodulin-dependent protein kinase II within its microtubule-binding domains at Ser-262 and Ser-356. *Biochem. J.* **316 (Pt 2)**, 655–660 (1996).

192. Hanger, D. P. *et al.* The complex relationship between soluble and insoluble tau in tauopathies revealed by efficient dephosphorylation and specific antibodies. *Febs Lett.***531**, 538–542 (2002).
193. Lebouvier, T. *et al.* The microtubule-associated protein tau is also phosphorylated on tyrosine. *J. Alzheimers Dis. JAD***18**, 1–9 (2009).
194. Liu, F., Iqbal, K., Grundke-Iqbal, I., Rossie, S. & Gong, C.-X. Dephosphorylation of tau by protein phosphatase 5: impairment in Alzheimer's disease. *J. Biol. Chem.***280**, 1790–1796 (2005).
195. Sergeant, N. *et al.* Biochemistry of Tau in Alzheimer's disease and related neurological disorders. *Expert Rev. Proteomics***5**, 207–224 (2008).
196. Spillantini, M. G. & Goedert, M. Tau pathology and neurodegeneration. *Lancet Neurol.***12**, 609–622 (2013).
197. Sergeant, N., Delacourte, A. & Buée, L. Tau protein as a differential biomarker of tauopathies. *Biochim. Biophys. Acta BBA - Mol. Basis Dis.***1739**, 179–197 (2005).
198. Lovestone, S. & Reynolds, C. H. The phosphorylation of tau: A critical stage in neurodevelopment and neurodegenerative processes. *Neuroscience***78**, 309–324 (1997).
199. Hernández, F., Lucas, J. J., Cuadros, R. & Avila, J. GSK-3 dependent phosphoepitopes recognized by PHF-1 and AT-8 antibodies are present in different tau isoforms. *Neurobiol. Aging***24**, 1087–1094 (2003).
200. Sergeant, N., Bussièrè, T., Vermersch, P., Lejeune, J. P. & Delacourte, A. Isoelectric point differentiates PHF-tau from biopsy-derived human brain tau proteins. *Neuroreport***6**, 2217–2220 (1995).
201. Köpke, E. *et al.* Microtubule-associated protein tau. Abnormal phosphorylation of a non-paired helical filament pool in Alzheimer disease. *J. Biol. Chem.***268**, 24374–24384 (1993).

202. Ksiezak-Reding, H., Liu, W. K. & Yen, S. H. Phosphate analysis and dephosphorylation of modified tau associated with paired helical filaments. *Brain Res.***597**, 209–219 (1992).
203. Buée, L., Bussièrè, T., Buée-Scherrer, V., Delacourte, A. & Hof, P. R. Tau protein isoforms, phosphorylation and role in neurodegenerative disorders. *Brain Res. Brain Res. Rev.***33**, 95–130 (2000).
204. Delobel, P. *et al.* Modelling Alzheimer-specific abnormal Tau phosphorylation independently of GSK3beta and PKA kinase activities. *FEBS Lett.***516**, 151–155 (2002).
205. Spires-Jones, T. L. *et al.* Passive immunotherapy rapidly increases structural plasticity in a mouse model of Alzheimer disease. *Neurobiol. Dis.***33**, 213–220 (2009).
206. Iqbal, K., Liu, F. & Gong, C.-X. Tau and neurodegenerative disease: the story so far. *Nat. Rev. Neurol.***12**, 15–27 (2016).
207. Goedert, M. Tau protein and the neurofibrillary pathology of Alzheimer's disease. *Trends Neurosci.***16**, 460–465 (1993).
208. Wischik, C. M. *et al.* Structural characterization of the core of the paired helical filament of Alzheimer disease. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.***85**, 4884–4888 (1988).
209. Wischik, C. M. & Crowther, R. A. Subunit structure of the Alzheimer tangle. *Br. Med. Bull.***42**, 51–56 (1986).
210. Cohen, T. J. *et al.* The acetylation of tau inhibits its function and promotes pathological tau aggregation. *Nat. Commun.***2**, 252 (2011).
211. Kingwell, K. Neurodegenerative disease: Targeting tau acetylation attenuates neurodegeneration. *Nat. Rev. Drug Discov.***14**, 748 (2015).
212. Min, S.-W. *et al.* Acetylation of tau inhibits its degradation and contributes to tauopathy. *Neuron***67**, 953–966 (2010).

213. Wilhelmus, M. M. M. *et al.* Transglutaminase 1 and its regulator Tazarotene-induced gene 3 localize to neuronal tau inclusions in tauopathies. *J. Pathol.***226**, 132–142 (2012).
214. Ledesma, M. D., Bonay, P., Colaço, C. & Avila, J. Analysis of microtubule-associated protein tau glycation in paired helical filaments. *J. Biol. Chem.***269**, 21614–21619 (1994).
215. Ledesma, M. D., Bonay, P. & Avila, J. Tau protein from Alzheimer's disease patients is glycosylated at its tubulin-binding domain. *J. Neurochem.***65**, 1658–1664 (1995).
216. Yan, S. D. *et al.* Glycosylated tau protein in Alzheimer disease: a mechanism for induction of oxidant stress. *Proc. Natl. Acad. Sci.***91**, 7787–7791 (1994).
217. Miyasaka, T. *et al.* Visualization of newly deposited tau in neurofibrillary tangles and neuropil threads. *J. Neuropathol. Exp. Neurol.***64**, 665–674 (2005).
218. Wedemeyer, W. J., Welker, E. & Scheraga, H. A. Proline Cis–Trans Isomerization and Protein Folding[†]. *Biochemistry (Mosc.)***41**, 14637–14644 (2002).
219. Reyes, J. F. *et al.* A Possible Link Between Astrocyte Activation and Tau Nitration in Alzheimer's disease. *Neurobiol. Dis.***31**, 198–208 (2008).
220. Dorval, V. & Fraser, P. E. Small ubiquitin-like modifier (SUMO) modification of natively unfolded proteins tau and alpha-synuclein. *J. Biol. Chem.***281**, 9919–9924 (2006).
221. Wang, J.-Z., Grundke-Iqbal, I. & Iqbal, K. Glycosylation of microtubule-associated protein tau: An abnormal posttranslational modification in Alzheimer's disease. *Nat. Med.***2**, 871–875 (1996).
222. Arnold, C. S. *et al.* The microtubule-associated protein tau is extensively modified with O-linked N-acetylglucosamine. *J. Biol. Chem.***271**, 28741–28744 (1996).
223. Lefebvre, T. *et al.* Evidence of a balance between phosphorylation and O-GlcNAc glycosylation of Tau proteins—a role in nuclear localization. *Biochim. Biophys. Acta BBA - Gen. Subj.***1619**, 167–176 (2003).

224. Simić, G., Diana, A. & Hof, P. R. Phosphorylation pattern of tau associated with distinct changes of the growth cone cytoskeleton. *Prog. Mol. Subcell. Biol.***32**, 33–48 (2003).
225. Mayer, A., Siegel, N. R., Schwartz, A. L. & Ciechanover, A. Degradation of proteins with acetylated amino termini by the ubiquitin system. *Science***244**, 1480–1483 (1989).
226. Morishimakawashima, M. *et al.* Ubiquitin Is Conjugated with Amino-Terminally Processed Tau in Paired Helical Filaments. *Neuron***10**, 1151–1160 (1993).
227. Schweers, O., Mandelkow, E. M., Biernat, J. & Mandelkow, E. Oxidation of cysteine-322 in the repeat domain of microtubule-associated protein tau controls the in vitro assembly of paired helical filaments. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.***92**, 8463–8467 (1995).
228. Park, S.-Y. & Ferreira, A. The generation of a 17 kDa neurotoxic fragment: an alternative mechanism by which tau mediates beta-amyloid-induced neurodegeneration. *J. Neurosci. Off. J. Soc. Neurosci.***25**, 5365–5375 (2005).
229. Landy, A. Dynamic, structural, and regulatory aspects of lambda site-specific recombination. *Annu. Rev. Biochem.***58**, 913–949 (1989).
230. Castoldi, M. & Popov, A. V. Purification of brain tubulin through two cycles of polymerization–depolymerization in a high-molarity buffer. *Protein Expr. Purif.***32**, 83–88 (2003).
231. *Surface Micelles as Revealed by Soft Contact Atomic Force Microscopy Imaging.* (ProQuest, 2008).
232. Pastré, D. *et al.* Anionic polyelectrolyte adsorption on mica mediated by multivalent cations: a solution to DNA imaging by atomic force microscopy under high ionic strengths. *Langmuir ACS J. Surf. Colloids***22**, 6651–6660 (2006).
233. Hamon, L., Curmi, P. A. & Pastré, D. High-resolution imaging of microtubules and cytoskeleton structures by atomic force microscopy. *Methods Cell Biol.***95**, 157–174 (2010).

234. Kutter, S., Eichner, T., Deaconescu, A. M. & Kern, D. Regulation of Microtubule Assembly by Tau and not by Pin1. *J. Mol. Biol.***428**, 1742–1759 (2016).
235. Choi, M. C. *et al.* Human microtubule-associated-protein tau regulates the number of protofilaments in microtubules: a synchrotron x-ray scattering study. *Biophys. J.***97**, 519–527 (2009).
236. Scott, C. W., Klika, A. B., Lo, M. M., Norris, T. E. & Caputo, C. B. Tau protein induces bundling of microtubules in vitro: comparison of different tau isoforms and a tau protein fragment. *J. Neurosci. Res.***33**, 19–29 (1992).
237. Aamodt, E. J. & Culotti, J. G. Microtubules and microtubule-associated proteins from the nematode *Caenorhabditis elegans*: periodic cross-links connect microtubules in vitro. *J. Cell Biol.***103**, 23–31 (1986).
238. Lee, G. & Rook, S. L. Expression of tau protein in non-neuronal cells: microtubule binding and stabilization. *J. Cell Sci.***102 (Pt 2)**, 227–237 (1992).
239. Schiff, P. B. & Horwitz, S. B. Taxol stabilizes microtubules in mouse fibroblast cells. *Proc. Natl. Acad. Sci.***77**, 1561–1565 (1980).
240. Askham, J. M., Vaughan, K. T., Goodson, H. V. & Morrison, E. E. Evidence That an Interaction between EB1 and p150Glued Is Required for the Formation and Maintenance of a Radial Microtubule Array Anchored at the Centrosome. *Mol. Biol. Cell***13**, 3627–3645 (2002).
241. Errico, A., Ballabio, A. & Rugarli, E. I. Spastin, the protein mutated in autosomal dominant hereditary spastic paraplegia, is involved in microtubule dynamics. *Hum. Mol. Genet.***11**, 153–163 (2002).
242. Smoter, M. *et al.* The role of Tau protein in resistance to paclitaxel. *Cancer Chemother. Pharmacol.***68**, 553–557 (2011).

243. Kar, S., Fan, J., Smith, M. J., Goedert, M. & Amos, L. A. Repeat motifs of tau bind to the insides of microtubules in the absence of taxol. *EMBO J.***22**, 70–77 (2003).
244. Dye, R. B., Fink, S. P. & Williams, R. C. Taxol-induced flexibility of microtubules and its reversal by MAP-2 and Tau. *J. Biol. Chem.***268**, 6847–6850 (1993).
245. Breuzard, G. *et al.* Molecular mechanisms of Tau binding to microtubules and its role in microtubule dynamics in live cells. *J. Cell Sci.***126**, 2810–2819 (2013).
246. Black, M. M., Slaughter, T., Moshiah, S., Obrocka, M. & Fischer, I. Tau is enriched on dynamic microtubules in the distal region of growing axons. *J. Neurosci. Off. J. Soc. Neurosci.***16**, 3601–3619 (1996).
247. Tabony, J. Microtubules viewed as molecular ant colonies. *Biol. Cell Auspices Eur. Cell Biol. Organ.***98**, 603–617 (2006).
248. Melki, R., Carlier, M. F. & Pantaloni, D. Oscillations in microtubule polymerization: the rate of GTP regeneration on tubulin controls the period. *EMBO J.***7**, 2653–2659 (1988).
249. Ojeda-Lopez, M. A. *et al.* Transformation of taxol-stabilized microtubules into inverted tubulin tubules triggered by a tubulin conformation switch. *Nat. Mater.***13**, 195–203 (2014).
250. Chu, P. J., Saito, H. & Abe, K. Polyamines promote regeneration of injured axons of cultured rat hippocampal neurons. *Brain Res.***673**, 233–241 (1995).
251. Song, Y. & Brady, S. T. Stabilization of neuronal connections and the axonal cytoskeleton. *Bioarchitecture***4**, 22–24 (2014).
252. Hamon, L., Savarin, P. & Pastré, D. Polyamine signal through gap junctions: A key regulator of proliferation and gap-junction organization in mammalian tissues? *BioEssays News Rev. Mol. Cell. Dev. Biol.* (2016). doi:10.1002/bies.201500195
253. Sharp, D. J. & Ross, J. L. Microtubule-severing enzymes at the cutting edge. *J. Cell Sci.***125**, 2561–2569 (2012).

254. Solowska, J. M. & Baas, P. W. Hereditary spastic paraplegia SPG4: what is known and not known about the disease. *Brain***138**, 2471–2484 (2015).
255. Voelzmann, A., Hahn, I., Pearce, S. P., Sánchez-Soriano, N. & Prokop, A. A conceptual view at microtubule plus end dynamics in neuronal axons. *Brain Res. Bull.* doi:10.1016/j.brainresbull.2016.08.006
256. White, S. R., Evans, K. J., Lary, J., Cole, J. L. & Luring, B. Recognition of C-terminal amino acids in tubulin by pore loops in Spastin is important for microtubule severing. *J. Cell Biol.***176**, 995–1005 (2007).
257. Blackstone, C., O’Kane, C. J. & Reid, E. Hereditary spastic paraplegias: membrane traffic and the motor pathway. *Nat. Rev. Neurosci.***12**, 31–42 (2011).
258. Lefèvre, J. *et al.* Structural Basis for the Association of MAP6 Protein with Microtubules and Its Regulation by Calmodulin. *J. Biol. Chem.***288**, 24910–24922 (2013).
259. Herzog, W. & Weber, K. Fractionation of Brain Microtubule-Associated Proteins. *Eur. J. Biochem.***92**, 1–8 (1978).
260. Lichtenberg-Kraag, B. & Mandelkow, E. M. Isoforms of tau protein from mammalian brain and avian erythrocytes: structure, self-assembly, and elasticity. *J. Struct. Biol.***105**, 46–53 (1990).
261. Montejo de Garcini, E., Carrascosa, J. L., Correas, I., Nieto, A. & Avila, J. Tau factor polymers are similar to paired helical filaments of Alzheimer’s disease. *FEBS Lett.***236**, 150–154 (1988).
262. Ruben, G. C. *et al.* The microtubule-associated protein tau forms a triple-stranded left-hand helical polymer. *J. Biol. Chem.***266**, 22019–22027 (1991).
263. García de Ancos, J., Correas, I. & Avila, J. Differences in microtubule binding and self-association abilities of bovine brain tau isoforms. *J. Biol. Chem.***268**, 7976–7982 (1993).
264. Di Noto, L., DeTure, M. A. & Purich, D. L. Disulfide-cross-linked tau and MAP2 homodimers readily promote microtubule assembly. *Mol. Cell Biol. Res. Commun. MCBRC2*, 71–76 (1999).

265. Sahara, N. *et al.* Assembly of two distinct dimers and higher-order oligomers from full-length tau. *Eur. J. Neurosci.* **25**, 3020–3029 (2007).
266. Song, Y. & Brady, S. T. Analysis of Microtubules in Isolated Axoplasm from the Squid Giant Axon. *Methods Cell Biol.* **115**, 125–137 (2013).
267. Makrides, V. *et al.* Microtubule-dependent oligomerization of tau. Implications for physiological tau function and tauopathies. *J. Biol. Chem.* **278**, 33298–33304 (2003).
268. Saunders, J. & Donhauser, Z. A Functional Analysis of the Projection Domain of the Microtubule Associated Protein Tau Using Force Spectroscopy. *FASEB J.* **27**, 1036.4-1036.4 (2013).
269. Rivas, G., Ferrone, F. & Herzfeld, J. Life in a crowded world. *EMBO Rep.* **5**, 23–27 (2004).
270. Fulton, A. B. How crowded is the cytoplasm? *Cell* **30**, 345–347 (1982).
271. Homouz, D., Perham, M., Samiotakis, A., Cheung, M. S. & Wittung-Stafshede, P. Crowded, cell-like environment induces shape changes in aspherical protein. *Proc. Natl. Acad. Sci.* **105**, 11754–11759 (2008).
272. Hatters, D. M., Minton, A. P. & Howlett, G. J. Macromolecular Crowding Accelerates Amyloid Formation by Human Apolipoprotein C-II. *J. Biol. Chem.* **277**, 7824–7830 (2002).
273. Minton, A. P. The Influence of Macromolecular Crowding and Macromolecular Confinement on Biochemical Reactions in Physiological Media. *J. Biol. Chem.* **276**, 10577–10580 (2001).
274. Derisbourg, M. *et al.* Role of the Tau N-terminal region in microtubule stabilization revealed by new endogenous truncated forms. *Sci. Rep.* **5**, 9659 (2015).
275. Takemura, R., Okabe, S., Umeyama, T. & Hirokawa, N. Polarity orientation and assembly process of microtubule bundles in nocodazole-treated, MAP2c-transfected COS cells. *Mol. Biol. Cell* **6**, 981–996 (1995).

276. Sakata, S., Inoue, Y. & Ishihara, K. Precise control of surface electrostatic forces on polymer brush layers with opposite charges for resistance to protein adsorption. *Biomaterials***105**, 102–108 (2016).
277. Tsujii, Y., Ohno, K., Yamamoto, S., Goto, A. & Fukuda, T. in *Surface-Initiated Polymerization I* (ed. Jordan, R.) 1–45 (Springer Berlin Heidelberg, 2006).
278. Peter, S. J. & Mofrad, M. R. K. Computational modeling of axonal microtubule bundles under tension. *Biophys. J.***102**, 749–757 (2012).
279. Levine, Z. A., Larini, L., LaPointe, N. E., Feinstein, S. C. & Shea, J.-E. Regulation and aggregation of intrinsically disordered peptides. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.***112**, 2758–2763 (2015).
280. Uversky, V. N., Winter, S., Galzitskaya, O. V., Kittler, L. & Lober, G. Hyperphosphorylation induces structural modification of tau-protein. *FEBS Lett.***439**, 21–25 (1998).
281. Hagestedt, T., Lichtenberg, B., Wille, H., Mandelkow, E. M. & Mandelkow, E. Tau protein becomes long and stiff upon phosphorylation: correlation between paracrystalline structure and degree of phosphorylation. *J. Cell Biol.***109**, 1643–1651 (1989).
282. Barghorn, S. *et al.* Structure, microtubule interactions, and paired helical filament aggregation by tau mutants of frontotemporal dementias. *Biochemistry (Mosc.)***39**, 11714–11721 (2000).
283. Jeganathan, S., von Bergen, M., Brumlach, H., Steinhoff, H.-J. & Mandelkow, E. Global hairpin folding of tau in solution. *Biochemistry (Mosc.)***45**, 2283–2293 (2006).
284. Jeganathan, S. *et al.* Proline-directed pseudo-phosphorylation at AT8 and PHF1 epitopes induces a compaction of the paperclip folding of Tau and generates a pathological (MC-1) conformation. *J. Biol. Chem.***283**, 32066–32076 (2008).

285. Chung, P. J. *et al.* Direct force measurements reveal that protein Tau confers short-range attractions and isoform-dependent steric stabilization to microtubules. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* **112**, E6416-6425 (2015).
286. Kadavath, H. *et al.* Tau stabilizes microtubules by binding at the interface between tubulin heterodimers. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* **112**, 7501–7506 (2015).
287. Bullmann, T., Holzer, M., Mori, H. & Arendt, T. Pattern of tau isoforms expression during development in vivo. *Int. J. Dev. Neurosci. Off. J. Int. Soc. Dev. Neurosci.* **27**, 591–597 (2009).
288. Caffrey, T. M., Joachim, C., Paracchini, S., Esiri, M. M. & Wade-Martins, R. Haplotype-specific expression of exon 10 at the human MAPT locus. *Hum. Mol. Genet.* **15**, 3529–3537 (2006).
289. Myers, A. J. *et al.* The MAPT H1c risk haplotype is associated with increased expression of tau and especially of 4 repeat containing transcripts. *Neurobiol. Dis.* **25**, 561–570 (2007).
290. Caffrey, T. M., Joachim, C. & Wade-Martins, R. Haplotype-specific expression of the N-terminal exons 2 and 3 at the human MAPT locus. *Neurobiol. Aging* **29**, 1923–1929 (2008).
291. Vershinin, M., Xu, J., Razafsky, D. S., King, S. J. & Gross, S. P. Tuning Microtubule-Based Transport Through Filamentous MAPs: The Problem of Dynein. *Traffic* **9**, 882–892 (2008).
292. Dixit, R., Ross, J. L., Goldman, Y. E. & Holzbaur, E. L. F. Differential Regulation of Dynein and Kinesin Motor Proteins by Tau. *Science* **319**, 1086–1089 (2008).
293. Tatebayashi, Y. Role of tau phosphorylation by glycogen synthase kinase-3 in the regulation of organelle transport. *J. Cell Sci.* **117**, 1653–1663 (2004).
294. Billingsley, M. L. & Kincaid, R. L. Regulated phosphorylation and dephosphorylation of tau protein: effects on microtubule interaction, intracellular trafficking and neurodegeneration. *Biochem. J.* **323 (Pt 3)**, 577–591 (1997).

295. Stamer, K., Vogel, R., Thies, E., Mandelkow, E. & Mandelkow, E.-M. Tau blocks traffic of organelles, neurofilaments, and APP vesicles in neurons and enhances oxidative stress. *J. Cell Biol.***156**, 1051–1063 (2002).
296. Mudher, A. *et al.* GSK-3 β inhibition reverses axonal transport defects and behavioural phenotypes in *Drosophila*. *Mol. Psychiatry***9**, 522–530 (2004).
297. Stoothoff, W. *et al.* Differential effect of three-repeat and four-repeat tau on mitochondrial axonal transport. *J. Neurochem.***111**, 417–427 (2009).
298. Marx, A., Müller, J., Mandelkow, E.-M., Hoenger, A. & Mandelkow, E. Interaction of kinesin motors, microtubules, and MAPs. *J. Muscle Res. Cell Motil.***27**, 125–137 (2006).
299. A, M., J, P., Em, M. & E, M. On the rigidity of the cytoskeleton: are MAPs crosslinkers or spacers of microtubules? *Cell. Mol. Biol. Noisy--Gd. Fr.***46**, 949–965 (2000).
300. Dubey, M., Chaudhury, P., Kabiru, H. & Shea, T. B. Tau inhibits anterograde axonal transport and perturbs stability in growing axonal neurites in part by displacing kinesin cargo: Neurofilaments attenuate tau-mediated neurite instability. *Cell Motil. Cytoskeleton***65**, 89–99 (2008).
301. Bougé, A.-L. & Parmentier, M.-L. Tau excess impairs mitosis and kinesin-5 function, leading to aneuploidy and cell death. *Dis. Model. Mech.***9**, 307–319 (2016).
302. Shahpasand, K., Ahmadian, S. & Riazi, G. H. A possible mechanism for controlling processive transport by microtubule-associated proteins. *Neurosci. Res.***61**, 347–350 (2008).
303. Shahpasand, K. *et al.* Regulation of Mitochondrial Transport and Inter-Microtubule Spacing by Tau Phosphorylation at the Sites Hyperphosphorylated in Alzheimer's Disease. *J. Neurosci.***32**, 2430–2441 (2012).
304. Kikumoto, M., Kurachi, M., Tosa, V. & Tashiro, H. Flexural Rigidity of Individual Microtubules Measured by a Buckling Force with Optical Traps. *Biophys. J.***90**, 1687–1696 (2006).

305. Mickey, B. & Howard, J. Rigidity of microtubules is increased by stabilizing agents. *J. Cell Biol.***130**, 909–917 (1995).
306. Appert-Rolland, C., Ebbinghaus, M. & Santen, L. Intracellular transport driven by cytoskeletal motors: General mechanisms and defects. *Phys. Rep.***593**, 1–59 (2015).
307. Zhang, Y. Microtubule length dependence of motor traffic in cells. *Eur. Phys. J. E Soft Matter***35**, 101 (2012).
308. Reese, L., Melbinger, A. & Frey, E. Crowding of Molecular Motors Determines Microtubule Depolymerization. *Biophys. J.***101**, 2190–2200 (2011).
309. Beeg, J. *et al.* Transport of Beads by Several Kinesin Motors. *Biophys. J.***94**, 532–541 (2008).
310. Mallik, R., Petrov, D., Lex, S. A., King, S. J. & Gross, S. P. Building Complexity: An In Vitro Study of Cytoplasmic Dynein with In Vivo Implications. *Curr. Biol.***15**, 2075–2085 (2005).
311. Correia, S. C., Perry, G. & Moreira, P. I. Mitochondrial traffic jams in Alzheimer's disease - pinpointing the roadblocks. *Biochim. Biophys. Acta BBA - Mol. Basis Dis.***1862**, 1909–1917 (2016).
312. Correia, S. C. *et al.* Alzheimer disease as a vascular disorder: Where do mitochondria fit? *Exp. Gerontol.***47**, 878–886 (2012).
313. Wang, Z.-X., Tan, L. & Yu, J.-T. Axonal transport defects in Alzheimer's disease. *Mol. Neurobiol.***51**, 1309–1321 (2015).
314. Stokin, G. B. *et al.* Axonopathy and transport deficits early in the pathogenesis of Alzheimer's disease. *Science***307**, 1282–1288 (2005).
315. Combs, B., Hamel, C. & Kanaan, N. M. Pathological conformations involving the amino terminus of tau occur early in Alzheimer's disease and are differentially detected by monoclonal antibodies. *Neurobiol. Dis.***94**, 18–31 (2016).
316. Gu, G. J. *et al.* Role of Individual MARK Isoforms in Phosphorylation of Tau at Ser262 in Alzheimer's Disease. *NeuroMolecular Med.***15**, 458–469 (2013).

317. Kuznetsov, I. A. & Kuznetsov, A. V. What tau distribution maximizes fast axonal transport toward the axonal synapse? *Math. Biosci.* **253**, 19–24 (2014).
318. Kuznetsov, I. A. & Kuznetsov, A. V. What mechanisms of tau protein transport could be responsible for the inverted tau concentration gradient in degenerating axons? *Math. Med. Biol. J. IMA* (2016). doi:10.1093/imammb/dqv041

Annexes

Ce travail de thèse a abouti à la publication de deux articles : le premier où j'apparais comme auteur principal, et le second où je suis quatrième auteur.



Role of tau in the spatial organization of axonal microtubules: keeping parallel microtubules evenly distributed despite macromolecular crowding

Alix Méphon-Gaspard¹ · Mirela Boca¹ · Catherine Pioche-Durieu² · Bénédicte Desforges¹ · Andrea Burgo¹ · Loïc Hamon¹ · Olivier Piétrement² · David Pastré¹

Received: 27 November 2015/Revised: 24 March 2016/Accepted: 1 April 2016/Published online: 13 April 2016
© The Author(s) 2016. This article is published with open access at Springerlink.com

Abstract Opposing views have been proposed regarding the role of tau, the principal microtubule-associated protein in axons. On the one hand, tau forms cross-bridges at the interface between microtubules and induces microtubule bundling in neurons. On the other hand, tau is also considered a polymer brush which efficiently separates microtubules. In mature axons, microtubules are indeed arranged in parallel arrays and are well separated from each other. To reconcile these views, we developed a mechanistic model based on in vitro and cellular approaches combined to analytical and numerical analyses. The results indicate that tau forms long-range cross-bridges between microtubules under macromolecular crowding conditions. Tau cross-bridges prevent the redistribution of tau away from the interface between microtubules, which would have occurred in the polymer brush model. Consequently, the short-range attractive force between microtubules induced by macromolecular crowding is avoided and thus microtubules remain well separated from each other. Interestingly, in this unified model, tau diffusion on microtubules enables to keep microtubules evenly distributed in axonal sections at low tau levels.

Keywords Alzheimer · Tauopathy · Cytoskeleton · Neuron

Electronic supplementary material The online version of this article (doi:10.1007/s00018-016-2216-z) contains supplementary material, which is available to authorized users.

✉ David Pastré
david.pastre@univ-evry.fr

¹ Institut National de la Santé et de la Recherche Médicale (INSERM), UMR1204, Université Evry-Val d'Essonne, Evry 91025, France

² UMR 8126, CNRS, Gustave Roussy Université Paris Sud, Université Paris-Saclay, Villejuif 94805, France

Introduction

Tau has been the subject of extensive studies by the past owing to its central role in many neurodegenerative diseases including Alzheimer's disease [1–6]. However, despite the in-depth study of tau functions in neurons, both its regulatory role in axonal architecture and its contribution to neurodegeneration remain open questions. In the most popular model, tau stabilizes microtubules in axons [6–15]. During neuronal degeneration, tau is phosphorylated and possibly released from microtubules, which may then destabilize axonal microtubules [12–15]. Here, we examine whether tau is specifically designed to prevent the formation of axonal microtubule bundles. Indeed, axonal microtubules are well separated in transverse sections of mature neurons [16–20]. This alternative role for tau has already been proposed by others based on the polymer brush model [21–23] but has not truly emerged in the scientific community. Tau is rather known to form microtubule bundles via complementary dimerization in between microtubules [24–26], which is hard to reconcile with its role as microtubule spacer. In addition, a continuous repulsive layer of tau on microtubules is required to keep microtubules separated in the polymer brush model [21–23, 27], which is most probably not relevant to the conditions found in axons. This point is even more critical since tau diffuses on microtubules [28] and thus has the possibility to move away from the interface between microtubules.

Besides these diverging views, studying whether tau keeps microtubules well separated in axons makes sense for two reasons: (1) their cylindrical geometry and rigid structure make microtubules prone to collapse due to short-range (<5 nm) excluded volume interactions in the crowded cellular environment [29, 30]; (2) the organization of axonal microtubules into parallel arrays significantly

increases the probability of microtubule bundling in axons. From a functional point of view, the surface of isolated microtubules is more accessible than in bundles. Keeping microtubules separated should then favor the accessibility of molecular motors to microtubule surface and thus the long-range transport of cargoes [20].

Here we propose and examine an alternative mechanistic model which reconciles tau-mediated microtubule bundling observed *in vitro* and the proposed physiological function of tau as a microtubule spacer. Indeed we describe how the formation of transient tau cross-bridges at the interface between parallel microtubules could lead to a very efficient separation of microtubules in axons. In addition, in this model, tau diffusion on microtubules enables an efficient separation of microtubules even at low tau levels, more in line with those found in axons.

Results

Analysis of the state of art and clarifications

Four points need to be clarified from the rich literature on tau and provide a basis for the present study:

1. In the literature, the fact that tau leads to the formation of microtubule bundles has been reported many times. Tau is then considered to be a positive regulator of microtubule bundling. This view stems mostly from the formation of microtubule bundles in neuronal and non-neuronal mammalian cells over-expressing tau [25, 26, 31–33]. As the spacing between microtubules in these bundles matches the length of the N-terminal domain of tau [31], this was considered as an evidence that tau can induce microtubule bundling. In line with this, the N-terminal domain of tau contains alternating clusters of positive and negative residues and can act as an antiparallel electrostatic zipper [24]. However, in electron micrographs of mature axon sections, microtubules appear as homogeneously distributed (for examples see [16–20]) and have a larger separation distance than in tau-mediated bundles (about 20 nm [32]). Along with this, the density of microtubules estimated from axonal sections in electron micrographs most frequently ranges from about 15 to 160 microtubules per μm^2 [16, 17, 34–37]. The mean spacing between microtubules thus ranges from 79 to 260 nm. These facts indicate that tau-mediated bundling is not prevalent in mature axons. The presence of axonal microtubule bundles can nevertheless be observed at early stage during axon differentiation [34] and in the axon hillock [38] with possible neuronal functions but this is not the norm.
2. In contrast, tau may act as a polymer brush and keep microtubules separated from each other. Based on thermal movements, the unstructured N-terminal domain of tau leads to a repulsion of entropic origin between microtubules [21, 23]. The so called “polymer brush” model works as long as tau forms a continuous repulsive layer on the microtubule surface. In addition, as recently measured [28, 39], tau is not immobile on microtubules but rather diffuses along the microtubule surface ($D = 0.15 \mu\text{m}^2/\text{s}$). The consequences of tau diffusion on the putative entropic repulsion occurring in the polymer brush model need to be clarified. Indeed diffusing tau can be redistributed away from the interface between microtubules. In this case, tau could no longer exert a repulsion force to keep microtubules separated. In the absence of any additional factors, only an elevated tau:tubulin molar ratio and its associated steric hindrance can prevent tau from moving away from the interface between microtubules [40], which leaves the relevancy of this model in axons questionable.
3. The tau:tubulin ratio in axons is actually poorly characterized. This is highly surprising since this information is critical to decipher the functions of tau in axons. In the literature and despite numerous publications on tau: microtubule interactions, only limited sources of data have been used to provide an estimation of the tau:tubulin molar ratio. In microtubules assembled from brain extracts [41], which may not be representative of axons, the reported tau:tubulin molar ratio was about 1:12 and 1:38 in gray and white matters, respectively. In another report [42], the tau:tubulin measured from undifferentiated to differentiated PC12 cell extracts ranges from about 1:34 to 1:5 and from 1:68 to 1:17. Tau concentration was also estimated using radioimmuno-slot-blot assay [43]. About 0.9 ng of tau per μg of proteins was found in postmortem human brain homogenates of grey matter. If we assume that there is about 30 ng of tubulin per μg of proteins in brain extract [44], the tau:tubulin molar ratio in neurons could be lower than 1:30 as grey matter contains more tubulin than white matter. In summary, all these data, although useful, do not provide a precise estimation of the specific tau:tubulin ratio in axons but rather a global estimation for neurons or brains. We therefore need to consider this point in the present study.
4. Microtubules are highly prone to form bundles under macromolecular crowding conditions. *In vitro*, 0.3–1 % (w/v) of PEG 35K (polyethylene glycol of 35 kDa), a neutral crowding agent, is sufficient to trigger microtubule bundling while more than about 10 % of PEG 35K are required for compacting DNA

under same ionic conditions [29]. Microtubules are rigid and large cylinders with diameters about 25 nm. They thus offer a large surface for excluded-volume interactions. In vitro, microtubule bundles obtained via excluded-volume interactions under macromolecular crowding conditions are tightly packed with wall-to-wall contacts, in contrast with the regularly spaced microtubules observed in tau-mediated bundles [30]. Microtubule-based transport should most probably be impaired in such compacted structures [45], which would be detrimental for most axonal functions.

The role of Tau 2N on microtubule bundling is biphasic

To reassess tau-mediated bundling in vitro and the impact of the tau:tubulin molar ratio in microtubule bundling, microtubule bundling was monitored by turbidimetry measurements at 37 °C [46] in the presence or absence of tau 2N, the longest tau isoform with four microtubule-binding domains (Figs. 1a and S1). The results indicate that tau 2N triggers microtubule bundling in both taxol-stabilized and non-stabilized microtubules at moderate ionic strength (Fig. 1b, c). The onset of microtubule bundling corresponds to a tau:tubulin molar ratio of about 1:30 and microtubule bundling increases steadily at higher ratios. These results were further confirmed by optical microscopy and atomic force microscopy analyzes. They revealed the appearance of aligned microtubules and loose microtubule bundles in the presence of tau 2N (Figs. 1d, e and S2). According to the literature, tau cross-bridging at the interface between two parallel microtubules is due to the presence of alternating positive and negative charges located in the N-terminal domain of tau [24]. An electrostatic zipper mechanism is therefore sensitive to the ionic strength or to the presence of perturbing zwitterions at high concentrations. In line with this, the presence of PIPES or MES at elevated concentrations (50 mM) or monovalent salts (>75 mM) impairs microtubule bundling mediated by tau 2N (figure S3), which may explain why microtubule bundling has not been detected in some reports [47, 48], in contrast to others [24, 49, 50]. We also cannot exclude that increasing the ionic strength reduces the affinity of tau for microtubules and, in turn, also reduces the probability to form tau cross-bridges. Indeed both the formation of tau cross-bridges and the binding of tau to microtubules are partly based on electrostatic interactions.

In order to examine the putative role of tau in microtubule bundling under macromolecular crowding conditions, we used PEG 35K whose size is comparable to proteins in the cell cytoplasm (about 4–5 nm). 1 % PEG 35K is sufficient to form microtubule bundles (Fig. 2a, c).

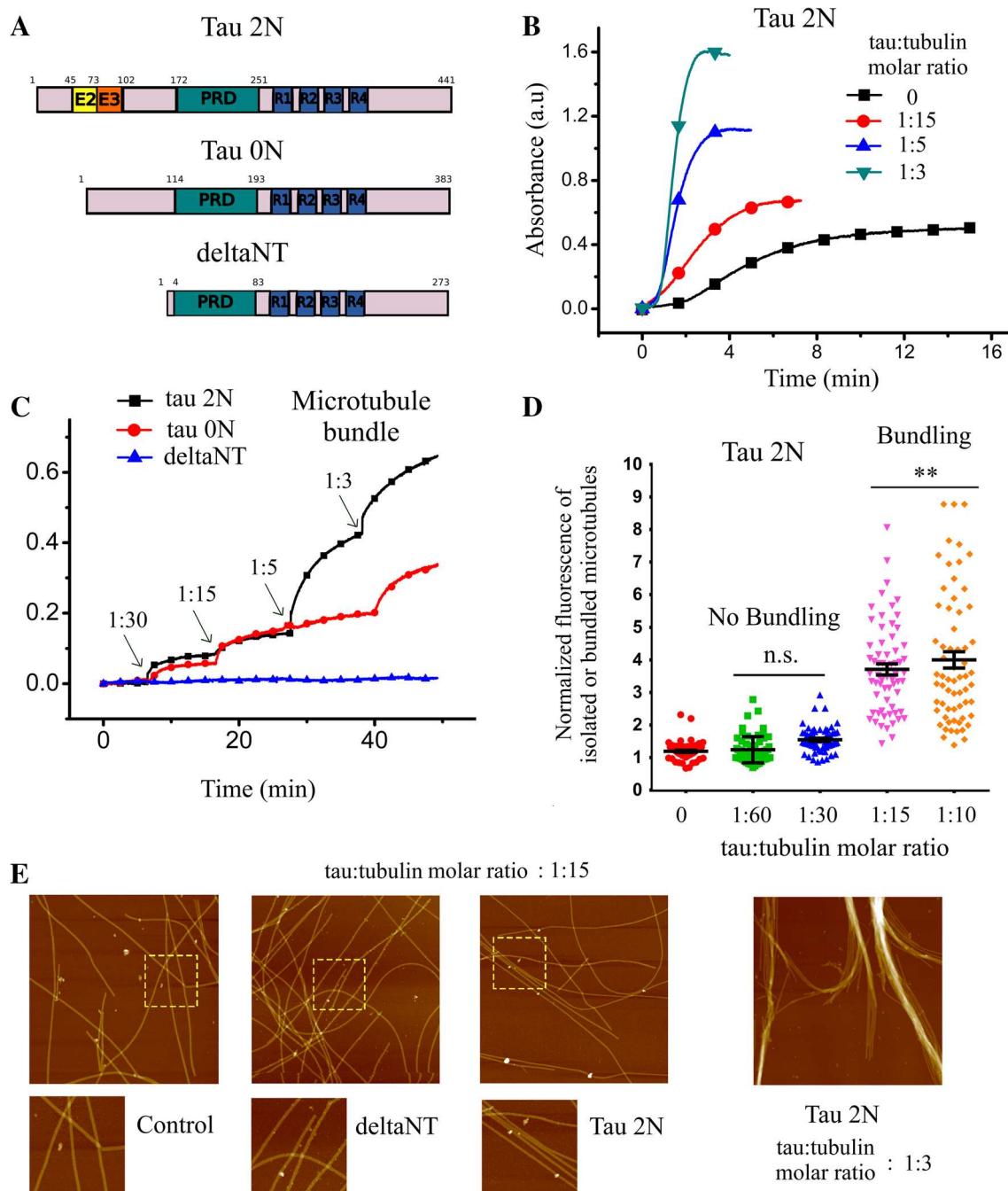
This pattern was not observed with PEG 1K because its size is not sufficient to induce significant excluded volume interactions [29]. We then analyzed whether tau 2N positively or negatively regulates the packing of microtubules under macromolecular crowding conditions. The formation of microtubule bundles was monitored by turbidimetry measurements in the presence of tau 2N after the addition of PEG 35K. The results reveal that tau 2N antagonizes the collapse of microtubules into tightly packed bundles. Importantly, at low tau-tubulin molar ratios, 1:30 and to a lesser extent at 1:60, tau 2N still antagonizes microtubule bundling (Fig. 2a). Analyzes by optical, atomic force and electron microscopies further confirm that tau 2N prevents the formation of tightly packed microtubule bundles under macromolecular crowding conditions (Fig. 2c–e).

The role of tau 2N in microtubule bundling could thus be misleading. On the one hand, in the absence of macromolecular crowding, tau 2N induces the formation of bundles at elevated tau:tubulin molar ratios. On the other hand, under macromolecular crowding conditions, tau 2N antagonizes microtubule bundling and so even at low tau 2N:tubulin molar ratios. Interestingly, at elevated ionic strength, tau 2N can no longer prevent microtubule bundling in the presence of PEG 35K (Figure S4A). As high ionic strengths also prevent microtubule bundling mediated by tau 2N in the absence of PEG 35K (Figure S3), there could be an unexpected correlation between the formation of tau cross-bridges between microtubules and the ability of tau to prevent microtubules from collapsing into tight bundles under macromolecular conditions.

The N-terminal domain is critical for preventing microtubule bundling under macromolecular conditions at low tau:tubulin molar ratio in vitro

To explore the role of the N-terminal domain of tau 2N on microtubule bundling, we considered three tau constructs (see Fig. 1a) of different N-terminal length: tau 2N, the longest tau 4R isoform used as a control, tau 0N, the smallest isoform of tau 4R, and deltaNT, tau 4R deleted from its N-terminal domain except part of the proline rich domain which is critical for the binding of tau to microtubules [51].

In the absence of macromolecular crowding, deltaNT shows no detectable microtubule bundling activity while tau 0N could form microtubule bundles but to a lesser extent than tau 2N (Fig. 1b). DeltaNT also fails to induce the formation of loose microtubule bundles as observed with tau 2N (Fig. 1e). The propensity of the tau constructs to form microtubule bundles thus correlates positively with the length of the N-terminal domain, which emphasizes the critical role played by the N-terminal domain of tau in microtubule bundling in vitro.



Importantly, under macromolecular crowding conditions, deltaNT cannot prevent microtubule bundling (Fig. 2b, c, e) and tau 0N limits the formation of microtubule bundles under macromolecular crowding conditions to a lesser extent than 2N (Fig. 2b). The formation of tau cross-bridges via the N-terminal domain at the interface between microtubules is thus possibly critical to prevent microtubules from collapsing into bundles under

macromolecular conditions, as observed by electron microscopy (Fig. 2e).

We have also examined whether tau 2N can dissociate microtubule bundles when they are preformed under macromolecular conditions. As shown in figure S4B, microtubules cannot be released from preformed bundles in the presence of tau 2N. Microtubule bundling under macromolecular crowding can thus be considered

Fig. 1 Tau leads to microtubule bundling in vitro via its N-terminal domain. **a** Schematic representation of the tau constructs used in this study. **b** Turbidimetry curves recorded in the presence of tubulin and tau 2N at indicated tau:tubulin molar ratios after raising the temperature from 5 to 37 °C. The increase of plateau value of the assembly curves in the presence of tau 2N could be the result of three putative and independent contributions: (1) increase of final microtubule mass, (2) tau aggregation, (3) tau-induced microtubule bundling [46]. We controlled that tau alone does not increase the absorbance so that the contribution of tau aggregation can be excluded. In addition, owing to the magnitude of the increase in the plateau value observed for tau:tubulin molar ratios of 1:5 and 1:3, microtubule stabilization cannot solely account for this phenomenon. Polymerization buffer: 10 mM HEPES–KOH pH 6.8, 30 mM KCl, 20 % glycerol, 1 mM EGTA, 4 mM MgCl₂, 1 mM GTP. 20 μM tubulin were used for microtubule polymerization. **c** Microtubule bundling observed via turbidimetry measurements of taxol-stabilized microtubules after the addition of tau 2N, tau 0N and deltaNT. In the presence of taxol, only microtubule bundling contributes to the increase of absorbance. Tau 2N gradually induces microtubule bundling. DeltaNT does not induce microtubule bundling. Same buffer as **b** with 10 μM tubulin and 5 μM taxol. **d** Statistical analysis of microtubule bundling obtained from optical microscope images of taxol-stabilized microtubules deposited on mica in the presence or absence of tau 2N or deltaNT (see figures S2 for details). The increase of the normalized fluorescence intensity reveals that tau 2N induces a massive microtubule bundling at tau:tubulin molar ratio higher than 1:15. Results are mean ± SD (*n* = 60). Two-tailed *t* test, ***p* < 0.01. **e** High resolution imaging by atomic force microscopy shows the formation of loose microtubule bundles in the presence of tau 2N at a tau:tubulin molar ratio of 1:15. Such pattern was not observed with deltaNT. At high tau:tubulin molar ratio (1:3), tau2N leads to the formation of large bundles. Same conditions as **c** with taxol-stabilized microtubules. Scanned area: 5 × 5 μm². Lower panels represent higher magnification images of the area corresponding to the *dashed squares*

irreversible regarding to the role of tau as microtubule spacer. In order to keep microtubules well separated from each other, tau 2N should therefore be located at the interface between microtubules before bundling takes place.

The N-terminal domain of tau antagonizes microtubule bundling in non-neuronal mammalian cells at low tau:tubulin fluorescence ratio

In contradiction with the experimental results obtained under macromolecular crowding conditions in vitro, tau overexpression in non-neuronal mammalian cells leads to the appearance of microtubule bundles [25, 26, 31, 32] (Fig. 3a). This fact has established tau as a bundling factor. However other facts have nuanced this view: (1) Experimental results showed that the N-terminal domain was not required for microtubule bundling ([7], Fig. 3a). This is surprising as this domain is responsible for microtubule bundling in vitro; (2) Microtubule stabilization by taxol is sufficient to induce the formation of microtubule bundles

[52], which indicates that Tau, solely via its microtubule-stabilizing activity, could induce microtubule bundling [7]; (3) When overexpressed in cells, many microtubule partners lead to microtubule bundling while it is not their primary functions. EB-1 is a protein which recognizes specifically the growing plus-ends of microtubules. When artificially overexpressed in cells, EB-1 stabilizes microtubules and leads to the formation of thick bundles [53]. Spastin, a microtubule-severing enzyme, is another example of a protein [54] that forms microtubule bundles when overexpressed and prevented from cutting microtubules in cells.

To better understand the role of tau on the spatial organization of microtubules in a cellular context, we analyzed the formation of microtubule bundles versus the tau:tubulin fluorescence ratio on microtubule structures in HeLa cells expressing tau 2N, tau 0N and deltaNT (see figure S5). The tau:tubulin fluorescence ratio should reflect the tau:tubulin molar ratio on microtubules. This parameter is therefore more informative than the percentage of cells displaying microtubule bundles [7]. At low tau:tubulin fluorescence ratios, neither of the tau constructs induces bundling (Figs. 3a, b and S5). In contrast, at high tau:tubulin fluorescence ratios, all the tau constructs induce bundling. The difference between the three tau constructs lies in the critical tau:tubulin fluorescence ratio required to induce microtubule bundling (Fig. 3b). Microtubule bundling appears at a significantly higher expression level for the longest tau isoform, tau 2N, than for deltaNT and, to a lesser extent, for the shortest isoform of tau, tau 0N. This result indicates that the N-terminal part of tau counteracts microtubule bundling as observed in vitro under macromolecular crowding conditions. To exclude the influence of varying microtubule stability, the same experiments were repeated in HeLa cells treated with taxol to stabilize microtubules and the results again indicate a negative regulation of microtubule bundling by the N-terminal domain of tau at low tau:tubulin fluorescence ratios (Fig. 3c, d).

We also considered microtubule bundling after osmotic shock in taxol-treated HeLa cells. Osmotic stress increases intracellular macromolecular crowding and leads to the formation of microtubule bundles, as previously reported [55]. In line with this, NaCl treatment indeed leads to the formation of microtubule bundles in control HeLa cells (figure S6A and B). Interestingly, the percentage of cells displaying microtubule bundles is not increasing significantly between cells expressing tau 2N under control and hypertonic conditions (figure S6A and B). Again, in cells displaying a low tau:tubulin fluorescence ratio, the presence of microtubule bundles after osmotic stress is less marked than at high tau:tubulin fluorescence ratio (figure S6C). However cells expressing deltaNT formed

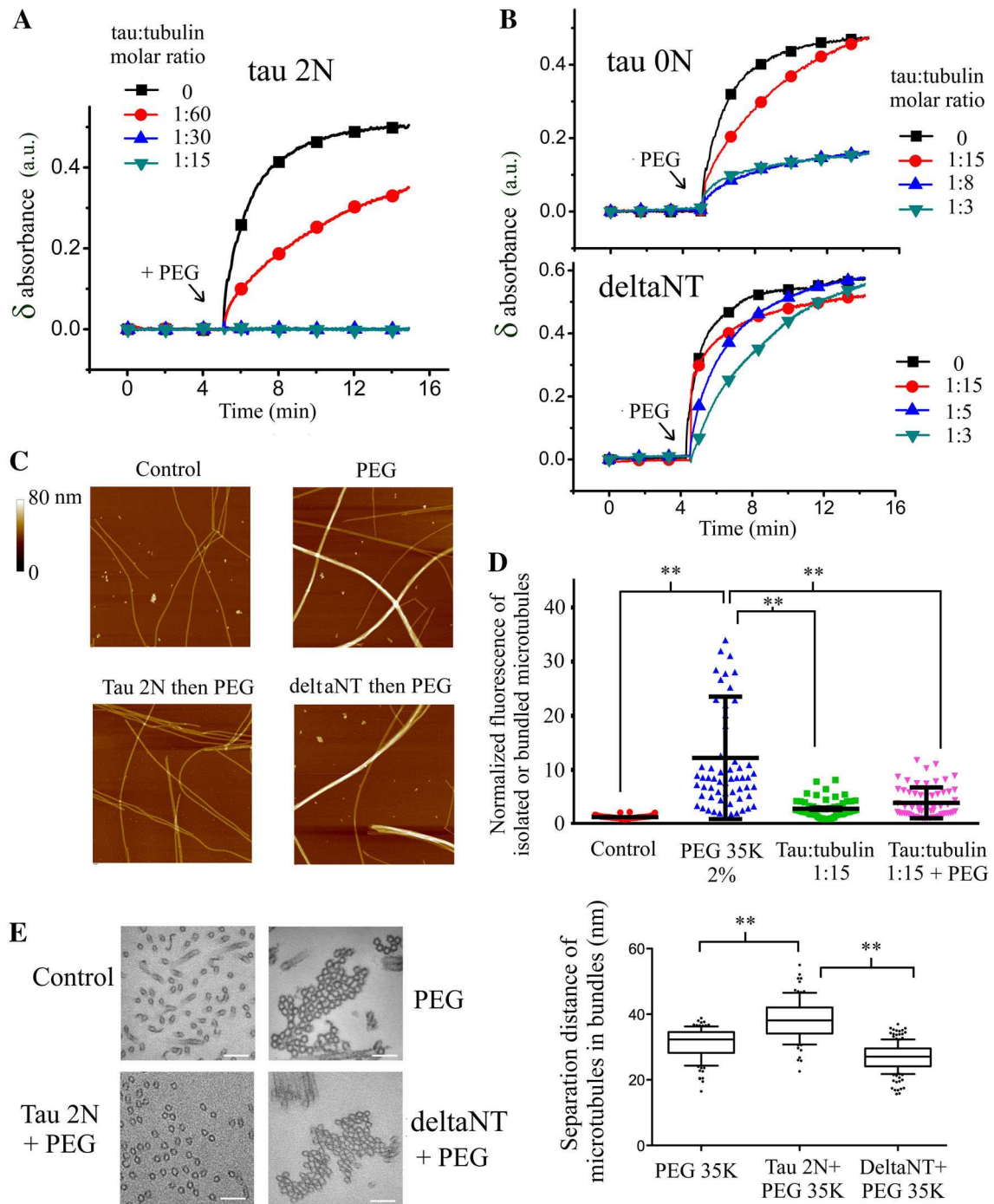


Fig. 2 Tau antagonizes microtubule bundling under macromolecular crowding conditions. **a** Variations of absorbance recorded after the addition of PEG 35K 1 % to taxol-stabilized microtubules in the absence or presence of tau 2N at indicated concentrations. The presence of tau 2N prior to adding PEG 35K blocks microtubule bundling and so even at low tau:tubulin molar ratio (1:30). Buffer: 10 mM HEPES–KOH pH 6.8, 30 mM KCl, 20 % glycerol, 1 mM EGTA, 4 mM MgCl₂, 1 mM GTP, 10 μM tubulin and 5 μM taxol. **b** Same experiments as **a** in the presence of tau 0N or deltaNT. DeltaNT fails to prevent microtubule bundling by PEG 35K. Tau 0N prevents microtubule bundling but to a lesser extent than tau 2N. **c** Atomic force microscopy images of taxol-stabilized microtubules after the addition of 1 % PEG 35K for 15 min. In control, PEG 35K leads to the appearance of tight microtubule bundles. In contrast with deltaNT, tau 2N inhibits the formation of tight microtubule bundles in the presence of PEG 35K 1 % for 15 min. Scanned area: 5 × 5 μm². **d** Statistical analyzes of microtubule bundling from optical microscopy images of taxol-stabilized microtubules deposited on mica in the presence of tau 2N. The addition of PEG 35K 1 % leads to the formation of microtubule bundles in control. The presence of tau 2N inhibits the massive microtubule bundling induced by the addition of PEG 35K. Results are mean ± SD (*n* = 60). Two-tailed *t* test, *******p* < 0.01. **e** Electron micrographs reveal that microtubules exposed to 1 % PEG 35K for 15 min form tightly packed bundles. In the presence of tau 2N, microtubules failed to form tightly packed bundles after the addition of PEG 35K. In contrast, the presence of deltaNT does not prevent the formation of tightly packed bundles under macromolecular crowding conditions. *Scale bars* 100 nm. Tau:tubulin molar ratio: 1:8 for both tau 2N and deltaNT. Statistical measurements of inter-microtubule distances (*center to center*) inside bundles under indicated conditions in the presence of 1 % PEG 35K. The separation distance is larger in the presence of tau 2N. Interestingly, the packing of microtubule with deltaNT is tighter than in control conditions. We attributed this fact to the neutralization of the *negatively* charged C-terminal tail of tubulin by the positive residues of deltaNT, which reduces the electrostatic repulsion of microtubules. Results are mean ± SD, (*n* > 95). Two-tailed *t* test, *******p* < 0.01

microtubule bundles whatever they were exposed to osmotic stress or not. Altogether these results indicate that the N-terminal domain of tau 2N, at low tau:tubulin ratio, antagonizes microtubule bundling in a cellular context.

An estimation of the tau:tubulin molar ratio in axons of mouse cortical neurons reveals that tau may not trigger but rather prevent the formation of microtubule bundles

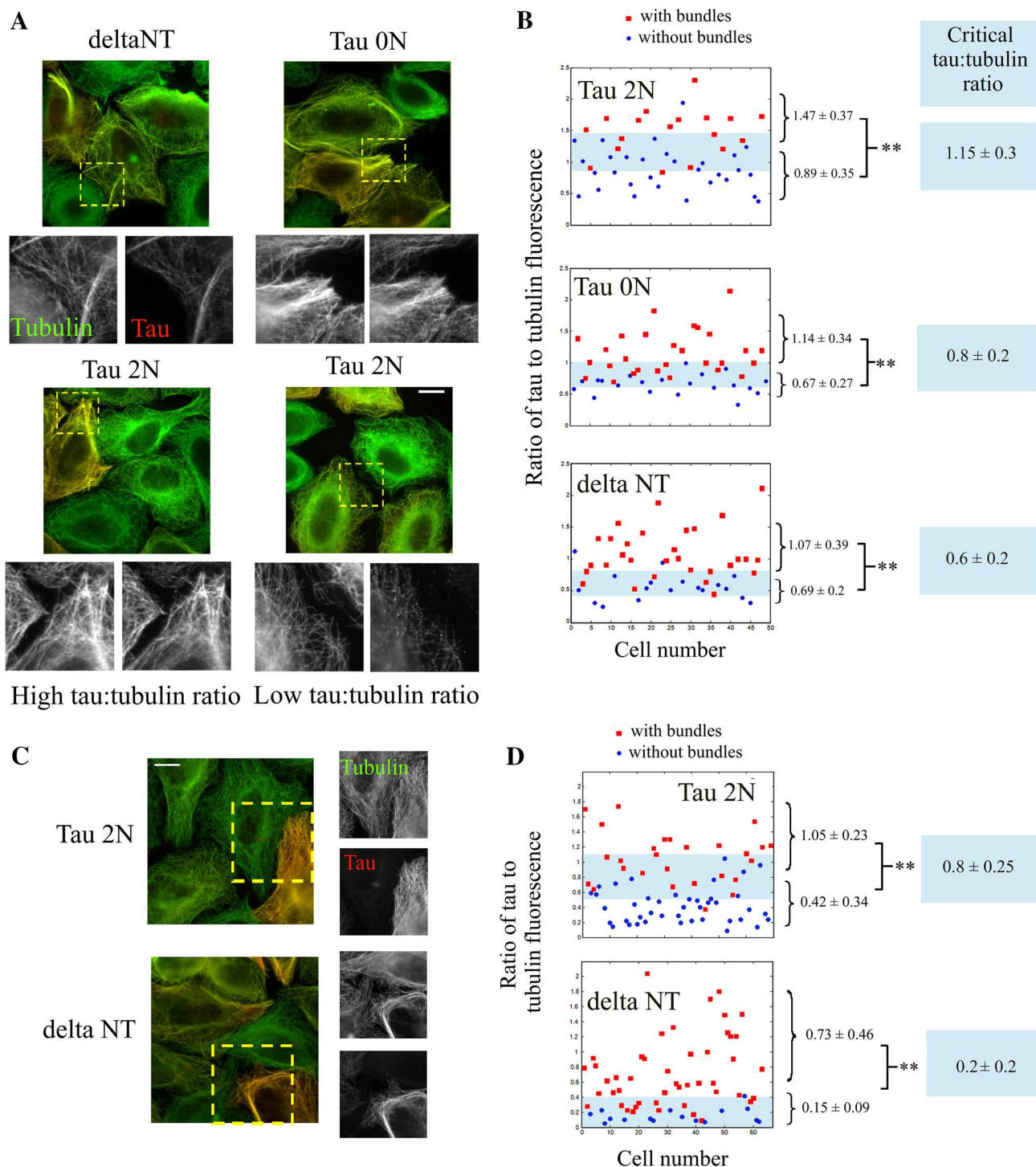
Tau promotes microtubule bundling in HeLa cells at elevated tau:tubulin fluorescence ratios while the N-terminal domain responsible for tau-mediated cross-bridges clearly antagonizes their formation at lower ratios. We then wondered which of these two regimes prevails in axons of mature primary neurons. To explore this point, we co-cultured primary mouse cortical neurons and HeLa cells expressing tau 2N and measured the tau:tubulin fluorescence ratio in both axons and transfected HeLa cells (Fig. 4a). HeLa cells thus serve as internal controls to

gauge the critical tau:tubulin fluorescence ratio for microtubule bundling. We noticed that the tau:tubulin fluorescence ratio was significantly lower in axons than in HeLa cells displaying microtubule bundles (Fig. 4a–c). To make a parallel between *in vitro* results with those obtained in cells, we recorded a calibration curve of the measured tau:tubulin fluorescence ratio on microtubules deposited on mica versus tau:tubulin molar ratio (Figs. 4d and S2). Using this calibration curve, the estimated value of the mean tau:tubulin molar ratio along axons is about 1:45, which is in line with the values previously reported. By comparison, in order to trigger microtubule bundling in HeLa cells, the tau:tubulin molar ratio should be larger than 1:8 for tau 2N. The tau:tubulin molar ratio in axons of cultured cortical neurons is thus probably not sufficient to induce microtubule bundling. These results are in line with an inhibition of microtubule bundling orchestrated by the N-terminal domain of tau. However, precautions should be taken before generalizing these results. The tau:tubulin of cortical neurons in culture for 7 days may not be representative of all neurons. In addition, the tau:tubulin ratio is not stable along axons and may increase in the apical region [56]. We thus cannot exclude that tau can initiate microtubule bundling in specific locations in axons.

Both numerical and analytical analyses predict that tau could be an efficient microtubule spacer owing to tau diffusion on microtubules

In the polymer brush model [57], tau is an unstructured polymer which coats the surface of particles to prevent their aggregation. For an efficient steric hindrance in the case of microtubules, scaling laws indicate that about 1 tau molecule for 6 tubulin dimers is required [40] (see Eq. 6 in supplementary data 1). The microtubule surface should then be half-saturated with tau (saturation ratio: 1:3), which is much too high to be relevant under physiological conditions. Along with this, tau diffuses on microtubules. If there is no force to keep tau at the interface between approaching microtubules, tau has the possibility to move away from the interface of microtubules via thermal diffusion (Fig. 5a). Consequently, tau cannot efficiently block microtubule bundling at low tau:tubulin ratios in the polymer brush model.

In the cross-bridge model, tau dimerization via the N-terminal domain can provide an energy benefit to keep tau at the interface between microtubules and prevent tau from bundling under macromolecular crowding conditions (Fig. 5a). In addition, tau cross-bridges will oppose the further approach of two interacting microtubules. The compression of tau cross-bridges at the interface between approaching microtubules indeed generates a repulsive force [58] and, accordingly, tau cross-bridges have been



considered as strings [59]. To perform numerical simulations, we considered that tau forms antiparallel cross-bridges at the interface between microtubules and assumed that tau dimerization can be disrupted when interacting microtubules move away from each other. The latter assumption seems justified as a massive microtubule

bundling was not observed at low tau:tubulin ratios (Fig. 2). Based on these hypotheses, the results of numerical simulations indicate that tau 2N is an efficient spacer for microtubules (Fig. 5b, Videos 1–4). Interestingly, tau diffusion reduces the critical tau:tubulin ratio required to prevent microtubule bundling. As the microtubule surface

Fig. 3 The N-terminal domain of tau antagonizes microtubule bundling in non-neuronal cells at low tau:tubulin fluorescence ratio. **a** Fluorescence microscopy of HeLa cells expressing Tau 2N, Tau 0N and deltaNT, as indicated in the figure. Anti-tubulin and anti-Tau immunofluorescences are represented in *red* and *green* respectively. The anti-tau antibody is directed against the C-terminal domain of tau and recognizes all the tau constructs used in this study. *Scale bar* 30 μm . **b** Statistical analyses of the formation of microtubule bundles in HeLa cells vs tau:tubulin fluorescence ratio for the three tau constructs. For both cells displaying microtubule bundles or not (see supplementary figure S7), the mean fluorescence ratios and standard deviations were determined. For all tau constructs, the ratios of tau:tubulin fluorescence were significantly different in cells with and without microtubule bundles as indicated in the figure. $^{***}p < 0.01$; two-tailed *t* test. Tau 2N induces microtubule bundling at a significantly higher tau:tubulin fluorescence ratio than deltaNT and to a lesser extent Tau 0N. The transition between bundling and no bundling occurs at a critical tau:tubulin fluorescence ratio indicated in the *figures* for each tau constructs. The critical fluorescence ratio and interval boundaries were estimated as the mean and difference between the ratios leading to 25 and 75 % of cells having microtubule bundles, respectively. The transition zone between bundling and no bundling is represented in *blue* in the figures. **c** Fluorescence microscopy of HeLa cells expressing either tau 2N or deltaNT and treated with 100 nM taxol for 8 h. Microtubule bundling appears as *less marked* in cells expressing tau 2N than in cells expressing deltaNT. *Scale bar* 30 μm . **d** Same as **b** for taxol-treated cells. Again, a higher tau:tubulin fluorescence ratio is required to induce microtubule bundling in cells expressing tau 2N than deltaNT

area scanned by tau increases with tau mobility, less tau is required to keep microtubule separated (Fig. 5b, c). To emphasize this point, an analytical approach shows that the number of diffusing tau proteins required to prevent the formation of microtubule bundles decreases linearly with the relative mobility of tau, $D_{\text{tau}}/D_{\text{MT}}$ where D_{tau} , D_{MT} are the diffusion constants of tau and microtubules, respectively (see supplementary text, Eq. 5). Interestingly, increasing the length of the N-terminal domain significantly reduces the number of tau molecules required for keeping microtubule separated (Fig. 5d and Eq. 5 in supplementary data 1).

Discussion

While microtubules form bundles in non-neuronal cells overexpressing tau, microtubules appear as rather homogeneously distributed in axonal sections of mature neurons [16, 17, 19]. The spatial separation of microtubules most probably favors long-range transport of vesicles, mitochondria and RNA along axons. To explain the spatial separation of axonal microtubules, tau was then considered as a microtubule spacer [21, 22]. In the polymer brush model, the separation between microtubules is due to the unstructured N-terminal domain of tau which acts as a repulsive layer. While such a mechanism deserves to be

considered, its application to tau and axonal microtubules has to be carefully analyzed. The point is that near-saturating concentrations of tau are required to form a continuous repulsive layer on microtubule surface. In axons, the tau:tubulin molar ratio ranges between 1:12 and 1:68 [41–43] and, here, an estimation based on calibrated immunofluorescence in axons of cortical neurons leads to a tau:tubulin molar ratio of about 1:45. The tau:tubulin molar ratios found in axons are therefore not sufficient to form a continuous layer on microtubule surface. Importantly, tau diffuses on the microtubule lattice. Tau has thus the possibility to move away from the interface between microtubules. In the absence of additional factors, microtubules should then form bundles under macromolecule crowding conditions (Figs. 5a, 6a).

To understand the mechanisms responsible for separating axonal microtubules, we considered that tau forms cross-bridges at the interface between microtubules. The energy benefit of forming cross-bridges allows the specific location of tau at the microtubule interface and thus prevents tau from moving away (Fig. 1a). At low tau:tubulin molar ratios, the formation of only few cross-bridges is not sufficient to trigger the formation of microtubule bundles by itself. However, when microtubules further approach from each other, the compression of tau cross-bridges generates an energy barrier. Consequently, the short-range attraction force due to macromolecular crowding can no longer take place (Fig. 6a), which precludes the formation of tightly packed microtubule bundles. In cells over-expressing tau, tau-cross-bridges are numerous and artificially induce microtubule bundling (Fig. 6b). In vitro, only elevated tau:tubulin molar ratios and moderate ionic strengths allow the clear detection of microtubule bundles (Figs. 1 and S3). The biphasic effect of tau on the spatial organization of microtubules is misleading and led to the biased view that tau promotes microtubule bundling in vivo.

Interestingly, thermally-induced movements of tau allow the exploration of a large surface area on the microtubule lattice in search for other tau proteins on the surface of other microtubules. Tau diffusion is thus critical to prevent microtubule bundling at tau:tubulin molar ratios well below the ratio required to saturate microtubules (Figs. 5b, c, 6b).

The unified view on the role of tau in axonal microtubule organization presented in this study provides new insights into the role of tau in neuronal functions. For example, tau was reported to impair the long-range transport of vesicles and mitochondria along microtubules via molecular motors, as observed repeatedly in cells overexpressing tau [60–63]. However, both tau diffusion on microtubules and its ability to form cross-bridges in between microtubules enable to keep microtubules

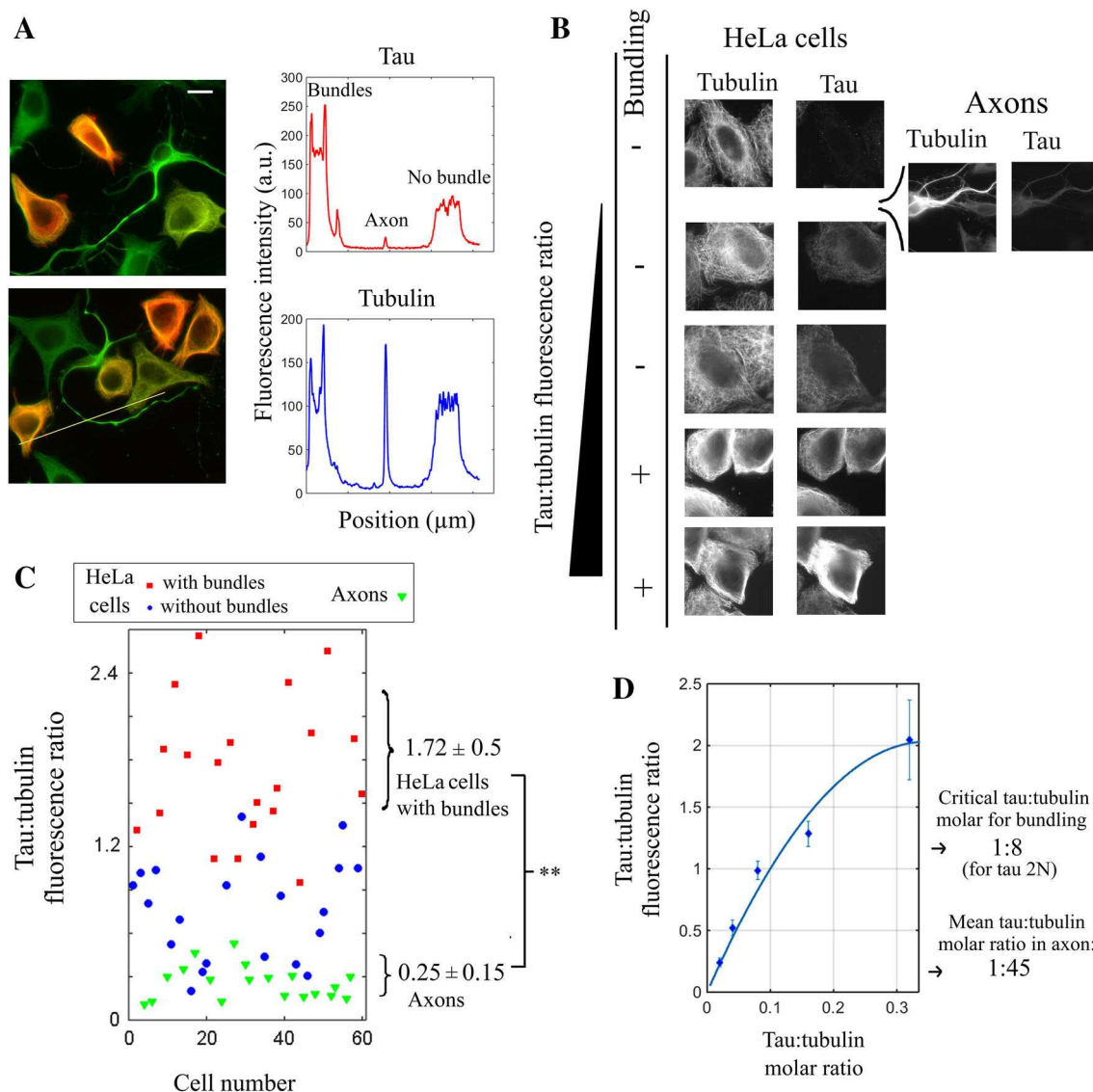


Fig. 4 In axons, the tau:tubulin molar ratio is not sufficient to trigger microtubule bundling and should rather prevent microtubules from bundling. **a** *Left panel* primary mouse cortical neurons were cultured for 7 days and then co-cultured with HeLa cells expressing Tau 2N for 8 h. Fluorescence microscopy reveals the expression levels of Tau in neurons and some HeLa cells. The anti-tau and anti-tubulin antibody fluorescence is represented in red and green, respectively. The anti-tau antibody recognizes an epitope in the C-terminus of tau which is conserved in both mouse and human. *Scale bar* 30 μm . *Right panel* fluorescence intensities of anti-tau and anti-tubulin antibodies along the yellow line represented in the bottom image of the left panel. The positions of the cells with or without microtubule bundles and the axon are indicated in the figure. **b** Images of HeLa cells and a representative axon sorted by their respective tau:tubulin fluorescence ratio. In axons, the tau:tubulin fluorescence ratio appears far lower than in HeLa cells having microtubule bundling. **c** Statistical analyzes

of the tau:tubulin fluorescence ratio measured in axons (green triangles) and HeLa cells (circles and squares) as described in Fig. 3. The axonal tau:tubulin fluorescence ratio is indeed significantly lower than in HeLa cells displaying microtubule bundles (we controlled that the presence of HeLa cells does not change the tau:tubulin fluorescence ratio measured in cultured neurons). **d** Calibration curve of the ratio of tau:tubulin fluorescence vs tau:tubulin molar ratio, which was measured from microtubules interacting with recombinant Tau 2N in vitro. Each dot represents the average over ten different measurements. The putative tau:tubulin molar ratio in axons was estimated by using the calibration curve and the mean tau:tubulin fluorescence ratio found in axons (0.17). The critical tau:tubulin molar ratio required to form microtubule bundles in HeLa cells was obtained by using the critical tau:tubulin fluorescence ratio for microtubule bundling (1.15 for tau 2N). The calibration curve was fitted with a second order polynome using a least square fitting

separated at low tau levels. At such low levels, the presence of tau on microtubules should therefore not constitute an obstacle for active transport of cargoes.

The consequences of alternative splicing of tau mRNA and tau phosphorylation on the spatial distribution of axonal microtubules also deserve to be considered and

could enlighten the process leading to axon degeneration observed in Alzheimer's disease. The results present here show that the tau isoform with the longest N-terminal domain (2N) is the most potent to prevent microtubules from bundling under macromolecular crowding conditions. During neurogenesis, tau isoforms with short N-terminal domain (0N and 1N) are expressed but their expression is significantly reduced in adult brain [64]. In mature axons, the presence of tau 2N could thus be necessary to keep microtubules homogeneously distributed. The role of the number of microtubule binding repeats (4R or 3R) may also matter. 4R isoforms bind to microtubules with a higher affinity than 3R isoforms but a strong binding also limits tau diffusion on microtubules. Experimental data are thus required to clarify whether tau 4R or 3R have a similar ability to prevent microtubule bundling.

In addition, tau phosphorylation leads to a lower affinity of tau for microtubules [65], which is considered critical for the redistribution of tau to the somatodendritic compartment and the accumulation of tau aggregates [66]. Our unified model however provides an alternative view. Tau phosphorylation events and especially those occurring in the proline rich and N-terminal domain may alter the capacity of tau to separate microtubules. An early event in Alzheimer's disease could thus be the collapse of axonal microtubules into tightly packed bundles due to inappropriate tau phosphorylation events. Further investigations should be carried out to explore this hypothesis.

Materials and methods

Preparation of sheep brain tubulin and subtilisin-treated tubulin

Tubulin was purified from sheep brains and stored at $-80\text{ }^{\circ}\text{C}$ in 20 mM MES-KOH, pH 6.9, 0.5 mM DTT, 0.5 mM EGTA, 0.25 mM MgCl_2 , 3.4 M glycerol, and 0.1 mM GTP. Before use, an additional cycle of polymerization was performed, and tubulin was resuspended in 20 mM MES-KOH, pH 6.9, 0.25 mM EGTA, 0.25 mM MgCl_2 . Tubulin concentration was determined by spectrophotometry using an extinction coefficient $\epsilon_{278\text{ nm}} = 1.2 \times 10^5\text{ M}^{-1}\text{ cm}^{-1}$ [28].

Turbidimetry measurements

The kinetics of microtubule assembly and (or) bundling was monitored by turbidimetry at 370 nm using an Ultrospec 3000 spectrophotometer (GE Healthcare, Fairfield, CT) equipped with a temperature controller. Microtubule assembly was obtained after preincubating tubulin samples on ice for 5 min in polymerization buffer (10 mM HEPES-

KOH pH 6.8, 30 mM KCl, 20 % glycerol, 1 mM EGTA, 4 mM MgCl_2 , 1 mM GTP) in the presence or absence of tau. Tubulin polymerization was then initiated by shifting the temperature to $37\text{ }^{\circ}\text{C}$. Microtubule bundling was monitored by turbidimetry at $37\text{ }^{\circ}\text{C}$ after adding either 1 % PEG 35K or tau at varying concentrations to taxol-stabilized microtubules in the indicated buffer.

Cloning of tau isoforms

Tau 2N/4R and deltaNT cDNAs were obtained by amplifying hTau40 pET29b plasmid (catalogue no. 16316, Addgene, Cambridge, MA) either from the beginning or from P172 to L441 using Phusion Hot Start II High-Fidelity DNA Polymerase (catalogue: F-537L, Thermo Fischer Scientific). The PCR products were first cloned into pENTR/D-TOPO by TOPO cloning (primers are listed in Supplemental Table 1) and then moved into pDEST17 by the LR reaction for recombinant protein expression with a His-Tag (Life Technologies). To obtain hTau24 three PCRs was necessary) using Hot Start II High-Fidelity DNA Polymerase (catalogue: F-537L, Thermo Fischer Scientific). Tau full length plasmid was used as template to design the primers and to amplify two fragments encoding hTau24 sequence (accession number NM_016834.4). For all PCRs, cycling was a 30 s initial denaturation at $98\text{ }^{\circ}\text{C}$, 35 cycles with 30 s denaturation at $98\text{ }^{\circ}\text{C}$ and a 30 s annealing at $72\text{ }^{\circ}\text{C}$ and a final extension also at $72\text{ }^{\circ}\text{C}$ for 5 min. PCRs product was cloned into pENTR/D-TOPO by TOPO cloning then moved into pDEST17 by the LR reaction.

Production of Human Tau Protein

Rosetta-gamiTM 2 competent cells were transformed with hTau40 (largest isoform), hTau24 (shortest 4R isoform), and deltaNT (mutant) expressed in Gateway[®] pDESTTM17 Vector (catalogue no. 11803-012, Life technologies). Bacteria were grown in LB medium in the presence of 100 $\mu\text{g/ml}$ ampicillin and 15 $\mu\text{g/ml}$ Chloramphenicol. Overexpression was induced at $A_{600\text{ nm}} = 0.5$ with 0.7 mM isopropyl β -D-thiogalactopyranoside, and incubation was continued for 3.5 h at $37\text{ }^{\circ}\text{C}$. Bacteria were pelleted by a 10-min, $4000\times g$ centrifugation, and the pellet was resuspended in Buffer A (25 mM Tris-HCl, 25 mM Mes-KOH, 500 mM NaCl, 0.2 mM MgCl_2 , 1 mM PMSF, 5 mM DTT, pH 7.5). Bacteria were then disrupted by sonication, and centrifuged for 10 min ($4000\times g$), the supernatant was then boiled for 20 min, and ultracentrifuged at $100,000\times g$ for 45 min at $4\text{ }^{\circ}\text{C}$. Clarified cell lysate was then loaded on a Ni^{2+} -nitrilotriacetic acid column (HisTrap HP, $1 \times 1\text{ ml}$, GE Healthcare Life Sciences). The proteins were eluted with 5 column volumes of

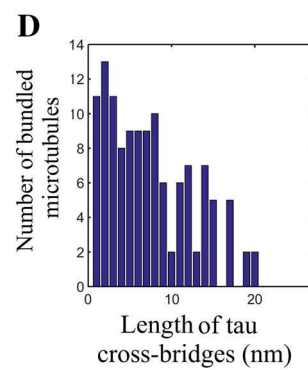
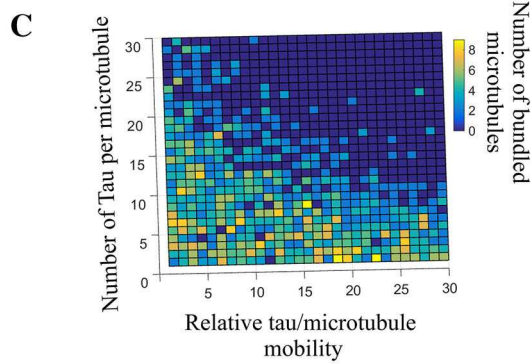
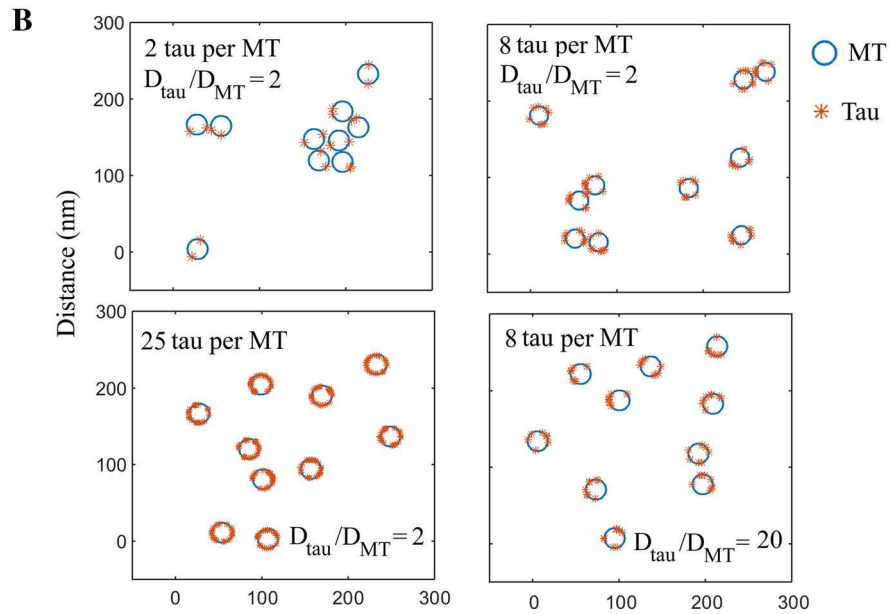
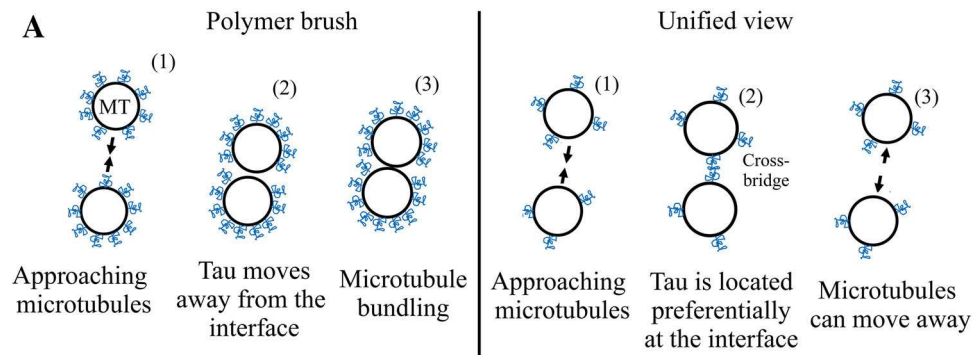


Fig. 5 Numerical simulations of the mechanism by which tau acts as a microtubule spacer. **a** Schematic representation of the polymer brush model and the alternative model proposed based on tau cross-bridges and tau diffusion. (1) In the polymer brush model, tau can move away from the interface between microtubules and thus cannot prevent microtubule bundling under macromolecular crowding conditions, unless sterical hindrance prevents tau movements at elevated tau:tubulin molar ratios. (2) Cross-bridging of tau at the interface between microtubule provides an energy benefit to place tau at the interface between microtubule. Tau cross-bridges then keep microtubules at distance and prevent short-range attraction between microtubules under macromolecular crowding conditions. **b** Numerical simulations of the spatial distribution of 10 microtubules moving on a $300 \times 300 \text{ nm}^2$ area. The number of tau molecules per microtubule, N , and the relative tau mobility, $\frac{D_{\text{tau}}}{D_{\text{MT}}}$, are as indicated in the figure. We remarked that both increasing the number of tau proteins per microtubule and the tau diffusion decreases the occurrence of bundling. $r_p = 5 \text{ nm}$ (range of excluded volume interactions); $r_c = 15 \text{ nm}$ (range of tau cross-bridges). Number of iterations: 10^5 . L the length of the microtubule, is 500 nm. See supplementary data 1 for details about the model. Here are represented the transverse views of the microtubule array. Tau molecules having different positions along microtubules are then projected on the section view. $D_{\text{tau}}/D_{\text{MT}}$ values ranging from 2 to 20 were used for the numerical simulations. This choice is based on the theoretical diffusion constant of a cylindrical molecule (Eq. 1, supplemental data 1), the estimated value of the cytoplasm viscosity and the varying length of microtubules (see supplemental data 1 for details). However, as D_{MT} in axons has not been measured, these values may be considered as arbitrary. **c** Number of bundled microtubules after completion of the numerical simulations vs the number of tau proteins per microtubule and the relative tau mobility along microtubules ($D_{\text{tau}}/D_{\text{MT}}$). Same conditions as **b**. **d** Numerical simulations indicating the number of bundled microtubules among 20 microtubules moving on a $350 \times 350 \text{ nm}^2$ area vs the range of tau cross-bridges, r_c . Number of iterations: 10^5 . $D_{\text{tau}}/D_{\text{MT}} = 3$. The other parameters are the same as B)

buffer B (25 mM Tris-HCl, 25 mM Mes-KOH, 250 mM NaCl, 250 mM Imidazole, 0.2 mM MgCl_2 , 1 mM PMSF, 5 mM DTT, pH 7.5). Purified proteins were then dialyzed overnight at 4 °C to cleave the His-Tag against 20 mM Tris, 20 mM Mes, 250 mM NaCl, 0.5 mM EDTA, 1 mM DTT, pH 7.5) using TEV protease (catalogue no. T4455, SIGMA). This step was followed by a second nickel-affinity chromatography to remove the uncleaved recombinant tau and TEV protease. Fractions of interest were combined and dialyzed against 25 mM Hepes, 250 mM NaCl, 0.25 mM DTT, 0.1 mM PMSF, pH 7.4 to eliminate traces of imidazole. Proteins were concentrated by ultrafiltration (Corning® Spin-X® UF 500, 10 kDa cut-off) and the final concentration of Tau was determined by amino acid analysis. All of the purification steps were performed in the presence of complete Protease Inhibitor Cocktail tablets (catalogue no. 00000001187358000, Roche Applied Science).

Atomic force microscopy

Samples containing microtubules and tau under specified conditions were deposited on freshly cleaved mica and dried for atomic force microscopy (AFM) imaging, using a protocol that we developed [67]. The electrostatic adsorption of microtubules on mica is mediated by magnesium ions present in the buffer. All AFM experiments were performed in peak force mode with Nanoscope V (Bruker/Veeco, Santa Barbara, CA). The peak force tapping mode was performed using silicon tips (Scanasyst-Air-HR, Bruker). The applied force was minimized as much as possible.

Transmission electron microscopy (TEM)

For ultrathin sectioning, microtubules were prepared with 20 μM tubulin with or without 7 μM of tau and (or) 1 % PEG 35K in 10 mM HEPES-KOH, 50 mM KCl, pH 6.8, 1 mM EGTA, 4 mM MgCl_2 and 1 mM GTP, 20 % glycerol. Microtubules were pelleted at $20,000 \times g$ for 30 min at 37 °C. The pellets were gently resuspended in 10 mM HEPES-KOH, 50 mM KCl, pH 6.8, 1 mM EGTA, 4 mM MgCl_2 and 1 mM GTP, 20 % glycerol, 1 % glutaraldehyde, 0.2 % tannic acid and incubated for fixation for 1 h at room temperature. Samples were then post-fixed with 1 % osmium tetroxide in cacodylate buffer 0.1 M, pH 7.3. After dehydration in ethanol bathes of increasing concentrations, pellets were embedded in epoxy resin (Embed-812 Embedding kit #14120, EMS). Collodion-carbon-coated copper grids were used to collect the ultrathin sections of 40 nm thickness. The sections were then stained sequentially with 2 % uranyl acetate aqueous and Reynold's solutions and analyzed in bright field mode using a Zeiss 902 transmission electron microscope. Images were acquired using a Megaview III CCD camera with the iTEM software (Olympus Soft Imaging Solution) at a magnification of 79,000 \times .

Immunofluorescence

HeLa cells and (or) neurons were grown on poly-L-lysine-coated glass coverslips and fixed in ice-cold methanol immediately followed by fixation in 4 % paraformaldehyde at 37 °C in PBS for 30 min. After fixation, cells were then washed and incubated for 1 h with mouse monoclonal anti-tubulin antibody (E7, 1:2000 dilutions) and anti-tau antibody (SC-1995, Santa-Cruz, CA). Cells were washed extensively in PBS and incubated for 1 h with fluoro-chrome (Alexa Fluor® 488 and -555)-coupled secondary antibodies (Invitrogen) in blocking solution. The protocol

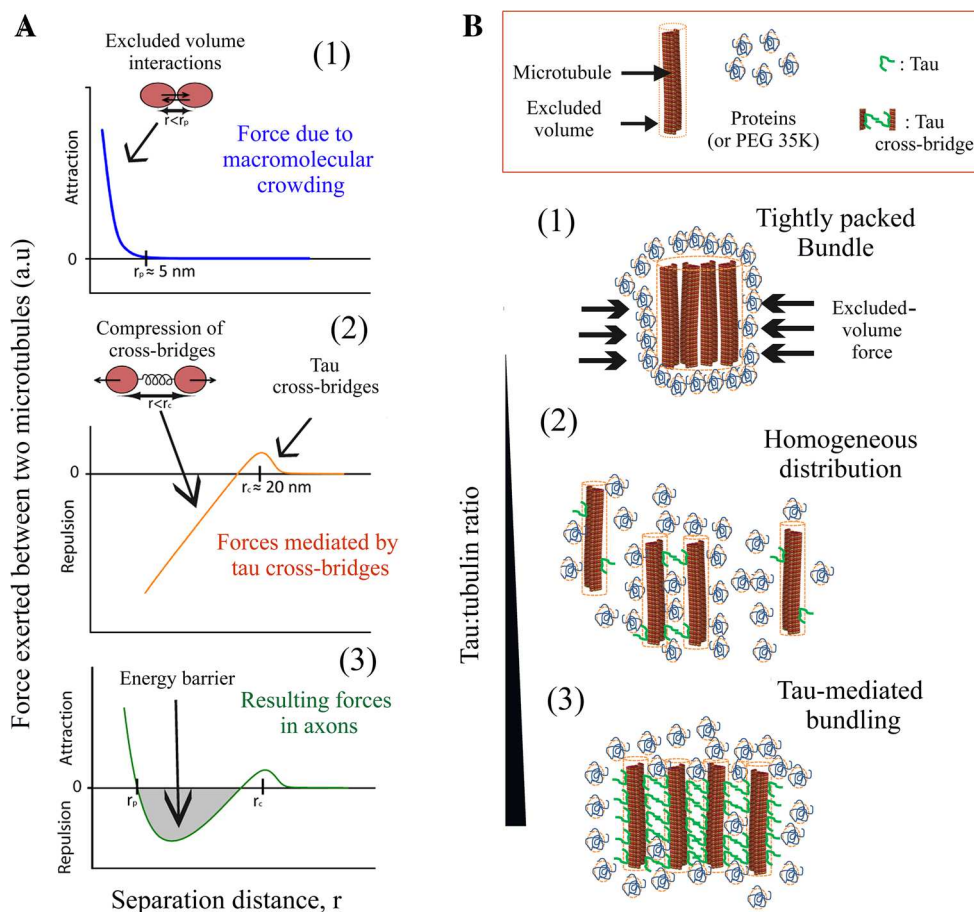


Fig. 6 Spatial organization of microtubules in the presence of tau under macromolecular crowding conditions. **a** Schematic curves representing forces vs separation distance between microtubules. 1 Macromolecular crowding induces a strong short-ranged attraction ($r < 5$ nm, average size of proteins) and the formation of tightly packed microtubule bundles. 2 The formation of tau cross-bridges between microtubules generates a long-ranged attraction (about 20 nm). However the compression of tau cross-bridges generates a repulsion force at shorter distances. 3 By combining the forces due to macromolecular crowding and tau cross-bridges, we notice the appearance of an energy barrier which could prevent microtubules from collapsing into tight bundles in axons. **b** Spatial organization of

microtubules at various tau:tubulin molar ratios. 1 In the absence of tau or at very low tau:tubulin molar ratios ($<1:60$ for tau 2N, in vitro), macromolecular crowding induces the collapse of microtubules into tight bundles. 2 At moderate tau:tubulin molar ratios (from about 1:60 to 1:15, in vitro), transient tau cross-bridges keep microtubules separated and prevent the formation of tightly packed microtubule bundles. No massive bundling is observed. We propose that this regime prevails in axons. 3 At elevated tau:tubulin ratios ($>1:15$), the formation of many tau cross-bridges induces the assembly of microtubule bundles in which the spacing between microtubules is about 15–20 nm. This regime prevails when tau is strongly over-expressed in HeLa cells

used to measure the tau:tubulin fluorescence ratios on microtubule structures is described in figure S5.

In vitro, microtubules were polymerized as described in “Turbidimetry measurements” and deposited on freshly cleaved mica. Samples were fixed with 4 % paraformaldehyde in PBS at 37 °C for 10 min. After fixation, samples were then washed three times in PBS and prepared for immunofluorescence as described above. The tau:tubulin fluorescence ratios were measured as described in figure S2.

Co-culture of neurons and HeLa cells

Cortical neurons from embryonic mice (E19) were prepared as described previously [68] and grown on Poly-L-ornithine-coated (Sigma-Aldrich) 14 mm coverslips at a density of 100,000 cells/coverslips in Neurobasal media, supplemented with 2 % B27, 2 mM L-glutamine. HeLa cells previously transfected with 2N tau by using Lipofectamine 2000 (Invitrogen) were co-cultured on neurons at 7-day in vitro (DIV) for 8 h.

Acknowledgments We gratefully acknowledge the Genopole Evry and INSERM for constant support of the laboratory. We also thank Maroun Charbel for helpful discussion about the model.


Open Access This article is distributed under the terms of the Creative Commons Attribution 4.0 International License (<http://creativecommons.org/licenses/by/4.0/>), which permits unrestricted use, distribution, and reproduction in any medium, provided you give appropriate credit to the original author(s) and the source, provide a link to the Creative Commons license, and indicate if changes were made.

References

- Cleveland DW, Hwo SY, Kirschner MW (1977) Physical and chemical properties of purified tau factor and the role of tau in microtubule assembly. *J Mol Biol* 116:227–247
- Ballatore C, Lee VM, Trojanowski JQ (2007) Tau-mediated neurodegeneration in Alzheimer's disease and related disorders. *Nat Rev Neurosci* 8:663–672
- Ittner LM, Gotz J (2011) Amyloid-beta and tau—a toxic pas de deux in Alzheimer's disease. *Nat Rev Neurosci* 12:65–72
- Kosik KS, Joachim CL, Selkoe DJ (1986) Microtubule-associated protein tau (tau) is a major antigenic component of paired helical filaments in Alzheimer disease. *Proc Natl Acad Sci U S A* 83:4044–4048
- Gustke N, Trinczek B, Biernat J, Mandelkow EM, Mandelkow E (1994) Domains of tau protein and interactions with microtubules. *Biochemistry* 33:9511–9522
- Morris M, Maeda S, Vossel K, Mucke L (2011) The many faces of tau. *Neuron* 70:410–426
- Lee G, Rook SL (1992) Expression of tau protein in non-neuronal cells: microtubule binding and stabilization. *J Cell Sci* 102(Pt 2):227–237
- Drechsel DN, Hyman AA, Cobb MH, Kirschner MW (1992) Modulation of the dynamic instability of tubulin assembly by the microtubule-associated protein tau. *Mol Biol Cell* 3:1141–1154
- Kadavath H, Hofele RV, Biernat J, Kumar S, Tepper K, Urlaub H, Mandelkow E, Zweckstetter M (2015) Tau stabilizes microtubules by binding at the interface between tubulin heterodimers. *Proc Natl Acad Sci U S A* 112:7501–7506
- Bunker JM, Wilson L, Jordan MA, Feinstein SC (2004) Modulation of microtubule dynamics by tau in living cells: implications for development and neurodegeneration. *Mol Biol Cell* 15:2720–2728
- Breuzard G, Hubert P, Nouar R, De Bessa T, Devred F, Barbier P, Sturgis JN, Peyrot V (2013) Molecular mechanisms of Tau binding to microtubules and its role in microtubule dynamics in live cells. *J Cell Sci* 126:2810–2819
- Grundke-Iqbal I, Iqbal K, Tung YC, Quinlan M, Wisniewski HM, Binder LI (1986) Abnormal phosphorylation of the microtubule-associated protein tau (tau) in Alzheimer cytoskeletal pathology. *Proc Natl Acad Sci U S A* 83:4913–4917
- Alonso AC, Grundke-Iqbal I, Iqbal K (1996) Alzheimer's disease hyperphosphorylated tau sequesters normal tau into tangles of filaments and disassembles microtubules. *Nat Med* 2:783–787
- Lindwall G, Cole RD (1984) Phosphorylation affects the ability of tau protein to promote microtubule assembly. *J Biol Chem* 259:5301–5305
- Busciglio J, Lorenzo A, Yeh J, Yankner BA (1995) beta-amyloid fibrils induce tau phosphorylation and loss of microtubule binding. *Neuron* 14:879–888
- Peters A, Vaughn JE (1967) Microtubules and filaments in the axons and astrocytes of early postnatal rat optic nerves. *J Cell Biol* 32:113–119
- Yamada KM, Spooner BS, Wessells NK (1971) Ultrastructure and function of growth cones and axons of cultured nerve cells. *J Cell Biol* 49:614–635
- Schulz A, Baader SL, Niwa-Kawakita M, Jung MJ, Bauer R, Garcia C, Zoch A, Schacke S, Hagel C, Mautner VF et al (2013) Merlin isoform 2 in neurofibromatosis type 2-associated polyneuropathy. *Nat Neurosci* 16:426–433
- Quraishe S, Cowan CM, Mudher A (2013) NAP (davunetide) rescues neuronal dysfunction in a Drosophila model of tauopathy. *Mol Psychiatry* 18:834–842
- Stephan R, Goellner B, Moreno E, Frank CA, Hugenschmidt T, Genoud C, Aberle H, Pielage J (2015) Hierarchical microtubule organization controls axon caliber and transport and determines synaptic structure and stability. *Dev Cell* 33:5–21
- Mukhopadhyay R, Kumar S, Hoh JH (2004) Molecular mechanisms for organizing the neuronal cytoskeleton. *Bioessays* 26:1017–1025
- Marx A, Pless J, Mandelkow EM, Mandelkow E (2000) On the rigidity of the cytoskeleton: are MAPs crosslinkers or spacers of microtubules? *Cell Mol Biol (Noisy-le-grand)* 46:949–965
- Mukhopadhyay R, Hoh JH (2001) AFM force measurements on microtubule-associated proteins: the projection domain exerts a long-range repulsive force. *FEBS Lett* 505:374–378
- Rosenberg KJ, Ross JL, Feinstein HE, Feinstein SC, Israelachvili J (2008) Complementary dimerization of microtubule-associated tau protein: implications for microtubule bundling and tau-mediated pathogenesis. *Proc Natl Acad Sci U S A* 105:7445–7450
- Kanai Y, Chen J, Hirokawa N (1992) Microtubule bundling by tau proteins in vivo: analysis of functional domains. *EMBO J* 11:3953–3961
- Kanai Y, Takemura R, Oshima T, Mori H, Ihara Y, Yanagisawa M, Masaki T, Hirokawa N (1989) Expression of multiple tau isoforms and microtubule bundle formation in fibroblasts transfected with a single tau cDNA. *J Cell Biol* 109:1173–1184
- Chung PJ, Choi MC, Miller HP, Feinstein HE, Raviv U, Li Y, Wilson L, Feinstein SC, Safinya CR (2015) Direct force measurements reveal that protein Tau confers short-range attractions and isoform-dependent steric stabilization to microtubules. *Proc Natl Acad Sci U S A* 112:E6416–E6425
- Hinrichs MH, Jalal A, Brenner B, Mandelkow E, Kumar S, Scholz T (2012) Tau protein diffuses along the microtubule lattice. *J Biol Chem* 287:38559–38568
- Bounedjah O, Hamon L, Savarin P, Desforgues B, Curmi PA, Pastre D (2012) Macromolecular crowding regulates assembly of mRNA stress granules after osmotic stress: new role for compatible osmolytes. *J Biol Chem* 287:2446–2458
- Needleman DJ, Ojeda-Lopez MA, Raviv U, Ewert K, Miller HP, Wilson L, Safinya CR (2005) Radial compression of microtubules and the mechanism of action of taxol and associated proteins. *Biophys J* 89:3410–3423
- Chen J, Kanai Y, Cowan NJ, Hirokawa N (1992) Projection domains of MAP2 and tau determine spacings between microtubules in dendrites and axons. *Nature* 360:674–677
- Baas PW, Pienkowski TP, Kosik KS (1991) Processes induced by tau expression in Sf9 cells have an axon-like microtubule organization. *J Cell Biol* 115:1333–1344
- Rodriguez-Martin T, Cuchillo-Ibanez I, Noble W, Nyenya F, Anderton BH, Hanger DP (2013) Tau phosphorylation affects its axonal transport and degradation. *Neurobiol Aging* 34:2146–2157
- Yu W, Baas PW (1994) Changes in microtubule number and length during axon differentiation. *J Neurosci* 14:2818–2829

35. Brunden KR, Zhang B, Carroll J, Yao Y, Potuzak JS, Hogan AM, Iba M, James MJ, Xie SX, Ballatore C et al (2010) Epothilone D improves microtubule density, axonal integrity, and cognition in a transgenic mouse model of tauopathy. *J Neurosci* 30:13861–13866
36. Liu Y, Lv K, Li Z, Yu AC, Chen J, Teng J (2012) PACSIN1, a Tau-interacting protein, regulates axonal elongation and branching by facilitating microtubule instability. *J Biol Chem* 287:39911–39924
37. Schaefer MK, Schmalbruch H, Buhler E, Lopez C, Martin N, Guenet JL, Haase G (2007) Progressive motor neuronopathy: a critical role of the tubulin chaperone TBCE in axonal tubulin routing from the Golgi apparatus. *J Neurosci* 27:8779–8789
38. Palay SL, Sotelo C, Peters A, Orkand PM (1968) The axon hillock and the initial segment. *J Cell Biol* 38:193–201
39. Cooper JR, Wordeman L (2009) The diffusive interaction of microtubule binding proteins. *Curr Opin Cell Biol* 21:68–73
40. Brittain WJ, Minko S (2007) A structural definition of polymer brushes. *J Polym Sci, Part A: Polym Chem* 45:3505–3512
41. Binder LI, Frankfurter A, Rebhun LI (1985) The distribution of tau in the mammalian central nervous system. *J Cell Biol* 101:1371–1378
42. Drubin DG, Feinstein SC, Shooter EM, Kirschner MW (1985) Nerve growth factor-induced neurite outgrowth in PC12 cells involves the coordinate induction of microtubule assembly and assembly-promoting factors. *J Cell Biol* 101:1799–1807
43. Khatoun S, Grundke-Iqbal I, Iqbal K (1992) Brain levels of microtubule-associated protein tau are elevated in Alzheimer's disease: a radioimmuno-slot-blot assay for nanograms of the protein. *J Neurochem* 59:750–753
44. Hiller G, Weber K (1978) Radioimmunoassay for tubulin: a quantitative comparison of the tubulin content of different established tissue culture cells and tissues. *Cell* 14:795–804
45. Conway L, Gramlich MW, Ali Tabei SM, Ross JL (2014) Microtubule orientation and spacing within bundles is critical for long-range kinesin-1 motility. *Cytoskeleton (Hoboken)* 71:595–610
46. Hamon L, Savarin P, Curmi PA, Pastre D (2011) Rapid assembly and collective behavior of microtubule bundles in the presence of polyamines. *Biophys J* 101:205–216
47. Brandt R, Lee G (1993) Functional organization of microtubule-associated protein tau. Identification of regions which affect microtubule growth, nucleation, and bundle formation in vitro. *J Biol Chem* 268:3414–3419
48. Choi MC, Raviv U, Miller HP, Gaylord MR, Kiris E, Ventimiglia D, Needleman DJ, Kim MW, Wilson L, Feinstein SC et al (2009) Human microtubule-associated-protein tau regulates the number of protofilaments in microtubules: a synchrotron x-ray scattering study. *Biophys J* 97:519–527
49. Scott CW, Klika AB, Lo MM, Norris TE, Caputo CB (1992) Tau protein induces bundling of microtubules in vitro: comparison of different tau isoforms and a tau protein fragment. *J Neurosci Res* 33:19–29
50. Aamodt EJ, Culotti JG (1986) Microtubules and microtubule-associated proteins from the nematode *Caenorhabditis elegans*: periodic cross-links connect microtubules in vitro. *J Cell Biol* 103:23–31
51. Goode BL, Denis PE, Panda D, Radeke MJ, Miller HP, Wilson L, Feinstein SC (1997) Functional interactions between the proline-rich and repeat regions of tau enhance microtubule binding and assembly. *Mol Biol Cell* 8:353–365
52. Schiff PB, Horwitz SB (1980) Taxol stabilizes microtubules in mouse fibroblast cells. *Proc Natl Acad Sci U S A* 77:1561–1565
53. Askham JM, Vaughan KT, Goodson HV, Morrison EE (2002) Evidence that an interaction between EB1 and p150(Glued) is required for the formation and maintenance of a radial microtubule array anchored at the centrosome. *Mol Biol Cell* 13:3627–3645
54. Errico A, Ballabio A, Rugarli EI (2002) Spastin, the protein mutated in autosomal dominant hereditary spastic paraplegia, is involved in microtubule dynamics. *Hum Mol Genet* 11:153–163
55. Desforgues B, Savarin P, Bounedjah O, Delga S, Hamon L, Curmi PA, Pastre D (2011) Gap junctions favor normal rat kidney epithelial cell adaptation to chronic hypertonicity. *Am J Physiol Cell Physiol* 301:C705–C716
56. Black MM, Slaughter T, Moshiaich S, Obrocka M, Fischer I (1996) Tau is enriched on dynamic microtubules in the distal region of growing axons. *J Neurosci* 16:3601–3619
57. Milner ST (1991) Polymer brushes. *Science* 251:905–914
58. Smyda MR, Harvey SC (2012) The entropic cost of polymer confinement. *J Phys Chem B* 116:10928–10934
59. Peter SJ, Mofrad MR (2012) Computational modeling of axonal microtubule bundles under tension. *Biophys J* 102:749–757
60. Stamer K, Vogel R, Thies E, Mandelkow E, Mandelkow EM (2002) Tau blocks traffic of organelles, neurofilaments, and APP vesicles in neurons and enhances oxidative stress. *J Cell Biol* 156:1051–1063
61. Mandelkow EM, Stamer K, Vogel R, Thies E, Mandelkow E (2003) Clogging of axons by tau, inhibition of axonal traffic and starvation of synapses. *Neurobiol Aging* 24:1079–1085
62. Dubey M, Chaudhury P, Kabiru H, Shea TB (2008) Tau inhibits anterograde axonal transport and perturbs stability in growing axonal neurites in part by displacing kinesin cargo: neurofilaments attenuate tau-mediated neurite instability. *Cell Motil Cytoskeleton* 65:89–99
63. Ebnet A, Godemann R, Stamer K, Illenberger S, Trinczek B, Mandelkow E (1998) Overexpression of tau protein inhibits kinesin-dependent trafficking of vesicles, mitochondria, and endoplasmic reticulum: implications for Alzheimer's disease. *J Cell Biol* 143:777–794
64. Bullmann T, Holzer M, Mori H, Arendt T (2009) Pattern of tau isoforms expression during development in vivo. *Int J Dev Neurosci* 27:591–597
65. Gu GJ, Lund H, Wu D, Blokzijl A, Classon C, von Euler G, Landegren U, Sunnemark D, Kamali-Moghaddam M (2013) Role of individual MARK isoforms in phosphorylation of tau at Ser(2)(6)(2) in Alzheimer's disease. *NeuroMol Med* 15:458–469
66. Noble W, Hanger DP, Miller CC, Lovestone S (2013) The importance of tau phosphorylation for neurodegenerative diseases. *Front Neurol* 4:83
67. Hamon L, Curmi PA, Pastre D (2010) High-resolution imaging of microtubules and cytoskeleton structures by atomic force microscopy. *Methods Cell Biol* 95:157–174
68. Danglot L, Triller A, Bessis A (2003) Association of gephyrin with synaptic and extrasynaptic GABAA receptors varies during development in cultured hippocampal neurons. *Mol cell Neurosci* 23:264–278

SCIENTIFIC REPORTS

**OPEN**

Probing protein interactions in living mammalian cells on a microtubule bench

Received: 27 July 2015

Accepted: 28 October 2015

Published: 27 November 2015

Mirela Boca¹, Dmitry A. Kretov^{1,2}, Bénédicte Desforges¹, Alix Mephon-Gaspard¹, Patrick A. Curmi¹ & David Pastré¹

Microtubules are μm -long cylinders of about 25 nm in diameter which are present in the cytoplasm of eukaryotic cells. Here, we have developed a new method which uses these cylindrical structures as platforms to detect protein interactions in cells. The principle is simple: a protein of interest used as bait is brought to microtubules by fusing it to Tau, a microtubule-associated protein. The presence of a protein prey on microtubules then reveals an interaction between bait and prey. This method requires only a conventional optical microscope and straightforward fluorescence image analysis for detection and quantification of protein interactions. To test the reliability of this detection scheme, we used it to probe the interactions among three mRNA-binding proteins in both fixed and living cells and compared the results to those obtained by pull-down assays. We also tested whether the molecular interactions of Cx43, a membrane protein, can be investigated with this system. Altogether, the results indicate that microtubules can be used as platforms to detect protein interactions in mammalian cells, which should provide a basis for investigating pathogenic protein interactions involved in human diseases.

Deciphering the complex interaction network of proteins in cells remains a challenging issue to understand the cell metabolism and function. To probe whether a protein of interest interacts with putative partners, high-throughput methods like yeast two-hybrid system^{1,2} or combination of affinity purification with mass spectrometry analysis^{2,3} are commonly used. Although these methods are essential to explore protein interactions at large scale, it is necessary to control the relevance of the proposed interactions in a context closer to native conditions, such as in living mammalian cells.

Different methods are then currently used to control the results of large-scale screening. For example, the colocalization between two proteins detected by fluorescence microscopy may indicate a putative interaction in mammalian cells. However, the use of colocalization assays is restricted to proteins confined to specific compartments like vesicles⁴. Other techniques like proximity ligation⁵, split-GFP⁶ and fluorescent resonance energy transfer (FRET,⁷) have also been developed to probe protein interactions in cells. These approaches present both strengths and limitations. Proximity ligation assays can reveal direct interactions between endogenous proteins but only in fixed cells. In addition, a rolling circle amplification procedure is required for detection and can bias the results. FRET uses short-range energy transfer to detect interactions between specifically modified proteins expressed in cells. A dedicated equipment is however required for analyzing the FRET signal. Furthermore, the FRET signal strongly depends on the distance and orientation between the donor and acceptor molecules, which has to be taken into account. In split-GFP experiments, the detection scheme is simple as the association between complementary GFP fragments attached to both bait and prey proteins leads to fluorescence but their intrinsic affinity also induces an inherent background.

¹Laboratoire Structure-Activité des Biomolécules Normales et Pathologiques, INSERM U1204 and Université Evry-Val d'Essonne, Evry, 91025 France. ²Institute of Protein Research, Russian Academy of Sciences, Pushchino, Moscow Region, 142290 Russia. Correspondence and requests for materials should be addressed to D.P. (email: david.pastre@univ-evry.fr)

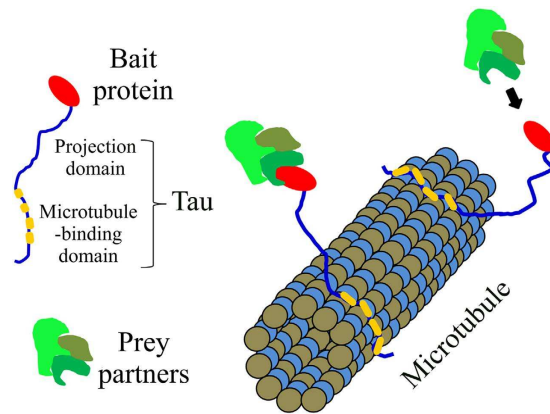


Figure 1. Schematic representation of the method used to detect protein interactions.

Here, we present a new method which uses the microtubule network as an intracellular platform to detect protein interactions in living cells. The principle is as follows: a bait protein is brought to microtubules so that it can still interact and attract its putative preys onto microtubules. The presence of a prey on microtubules then reveals an effective interaction. This method can work with various prey molecules including nucleic acids and proteins and can detect both direct and indirect interactions. Microtubules are ideal platforms to probe protein interactions at the level of single cell for two reasons. (i) The surface area offered by microtubules is potentially enormous which should prevent saturation by bait proteins in most cases. Indeed, if we consider the number of microtubules per cell⁸, simple math indicates that the surface area of microtubules is larger than about $70\mu\text{m}^2$ in typical mammalian cells like HeLa cells. If the bait protein requires an interacting surface area of 10nm^2 , virtually, more than 7×10^6 bait copies per cell can be anchored to microtubules. (ii) The microtubule network has a characteristic filamentous structure, which is a major advantage. An interaction between bait and prey indeed leads to the appearance of this characteristic structure in the fluorescence image of the prey. Protein interaction on a microtubule bench can then be easily distinguished in the cell cytoplasm and should allow a highly sensitive detection scheme by using numerical tools.

To explore the validity of this method, we first considered whether Tau, a microtubule-associated protein, can help to bring a bait protein onto microtubules, which is a prerequisite for the present detection scheme. We then examined if interactions among mRNA-binding proteins can be detected by using microtubules as platforms. We also developed a protocol to analyze the interactions between bait and prey from fluorescence images of cells. We finally tested whether the present method can be used to probe the interaction of other proteins like membrane proteins.

Results and Discussion

Tau brings bait proteins onto microtubules and preserves the accessibility of baits to molecular partners.

Various strategies can be considered to bring a protein onto microtubules and to use it as bait. Fusing the bait protein directly to tubulin, the building block of microtubules, may not be relevant since the concentration of free tubulin exceeds $10\mu\text{M}$ in mammalian cells. Only a small fraction of bait proteins would thus be brought to microtubules⁹. Alternatively, microtubule-associated proteins (MAPs) like Tau can be used for this purpose (Fig. 1). Tau has a higher affinity for microtubules than for free tubulin¹⁰. Moreover, the bait protein can be fused to the unstructured N-terminal domain of Tau (11) which should keep the bait protein away from the microtubule surface. Increasing the spacing between the bait protein and the microtubule surface is indeed critical to preserve putative bait:prey interaction (Supplementary Figure S1A). We tested the efficiency of Tau fusion with two established mRNA-binding proteins, YB-1¹¹ and G3BP1¹², used as baits. Importantly, these two proteins have a diffuse distribution throughout the cytoplasm and were not found enriched on microtubules in HeLa cells (Supplementary Figure S1C). After their fusion to the N-terminal end of Tau with an additional fluorescent label, the two constructs, YB-1-RFP-Tau and G3BP1-RFP-Tau, were clearly brought to microtubules (Fig. 2A). To explore whether YB-1-RFP-Tau and G3BP1-RFP-Tau can still interact with their physiological substrate, mRNA, we probed the presence of poly(A) mRNAs on microtubules via *in situ* hybridization (Fig. 2A). The results indicate that the two bait proteins are able to bring large molecules such as mRNA on microtubules. As YB-1 interacts mostly with mRNA in cells¹³, we also explored whether mRNA preferential colocalizes with YB-1-RFP-Tau by comparison with ribosomal RNAs (Supplementary Figure S2A). To that end, we used the spearman coefficient^{14,15}, which reflects the colocalization level between bait and prey. It is closely-related to the Pearson coefficient¹⁶ but includes nonlinear relationship. As the fluorescence intensity on microtubules does not necessarily increase linearly with the number of fluorescent bait or prey, the spearman coefficient is therefore more adapted to the present analysis than the Pearson coefficient. The value of the spearman coefficient should normally range from 0 to 1, which reflects no

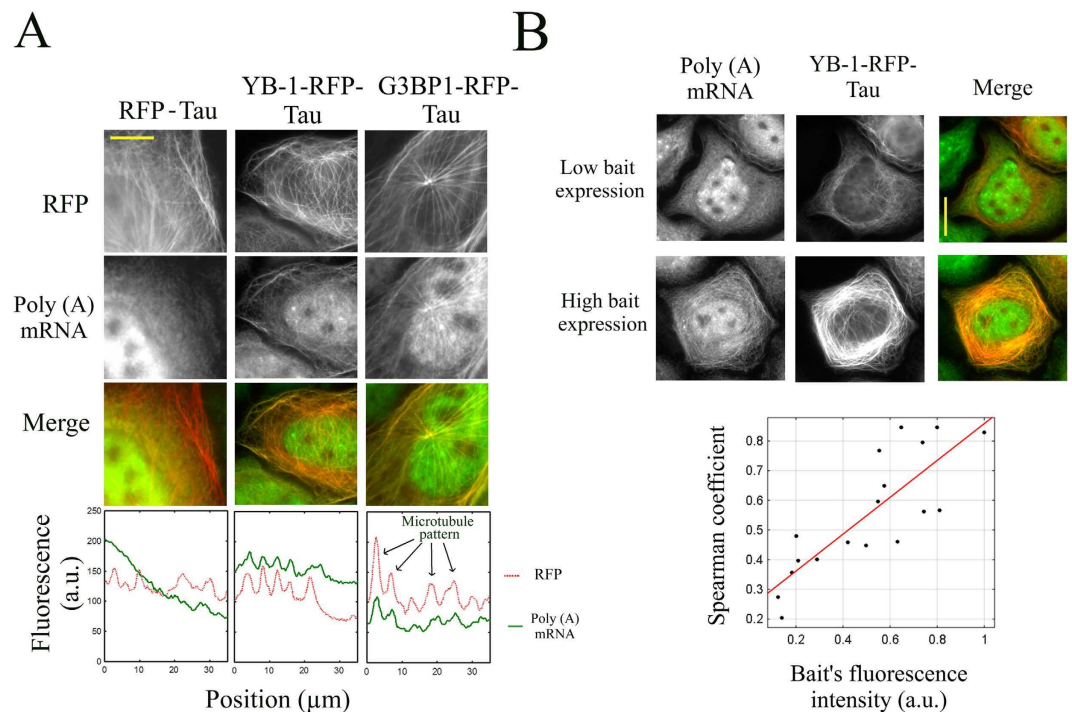


Figure 2. mRNA-binding proteins fused to Tau bring mRNAs onto microtubules in cells. (A) The micrographs show that two mRNA-binding proteins, YB-1 and G3BP1, when fused to Tau, brought mRNA onto microtubules. A fluorescent Poly(T) probe was used to detect Poly(A) mRNA. Tau-RFP is used as a control. Scale bar: 15 μm. In the presence of mRNA-binding proteins fused to Tau, representative line profiles reveal the binding of mRNA to microtubules. (B) Upper panel: fluorescence images of cells expressing YB-1-RFP-Tau at different levels reveal that the relocation of mRNA on microtubules is clearer at higher than lower bait expression level. Poly(A) mRNA was detected by using a fluorescent Poly(T) probe. Scale bar: 15 μm. Lower panel: the spearman coefficient, which reflects the degree of colocalization between mRNA and YB-1-RFP-Tau, used as bait, increases with the bait's fluorescence intensity.

apparent or perfect colocalization, respectively. A negative value indicates that the prey protein may be excluded from the microtubule vicinity. The measurements of the spearman coefficient reveal that YB-1-RFP-Tau significantly colocalizes with poly(A) mRNA but to a lesser extent with ribosomal RNAs (Supplementary Figure S2B). As expected, YB-1-RFP-Tau thus preferentially interacts with mRNA rather than with ribosomal RNAs on microtubules.

The microtubule surface is not saturated by bait proteins even when expressed at high levels.

A major advantage of using microtubules as platforms lies on the large surface area that they offer, which should theoretically preclude saturation by the bait protein. If saturation takes place, any bait protein in excess could capture a putative prey in the bulk cytoplasm. The chances of detecting bait:prey interactions on microtubules would therefore be reduced and in turn the sensitivity of the detection scheme would be impaired. However the surface area truly available on microtubules has not been reported so far. Microtubules interact with many other proteins like MAPs and molecular motors which can compete with the bait proteins for the binding to microtubules. To estimate the space available for bait proteins on microtubules, we measured the spearman coefficient reflecting the colocalization score between mRNA and YB-1-RFP-Tau for different expression levels of YB-1-RFP-Tau. If saturation arises above a critical expression level of YB-1-RFP-Tau, the correlation coefficient should no longer increase. However the spearman coefficient rather increases steadily with the expression level of YB-1-RFP-Tau which indicates that more mRNAs were brought to microtubules. The surface of microtubules was thus not saturated under the conditions tested (Fig. 2B).

Microtubules can be used as platforms for detecting the interactions among mRNA-binding proteins. To further document the method, we then probed in fixed and living cells the interactions of YB-1-RFP-Tau, used as bait, with protein partners belonging to cytoplasmic mRNA-binding proteins (Fig. 3A, videos 1 and 2). In this case, the detected interaction may result from a direct interaction between mRNA-binding proteins or from a significant overlap in their mRNA targets. Considering these parameters, we chose three different prey proteins: YB-1, G3BP1 and Lin28.

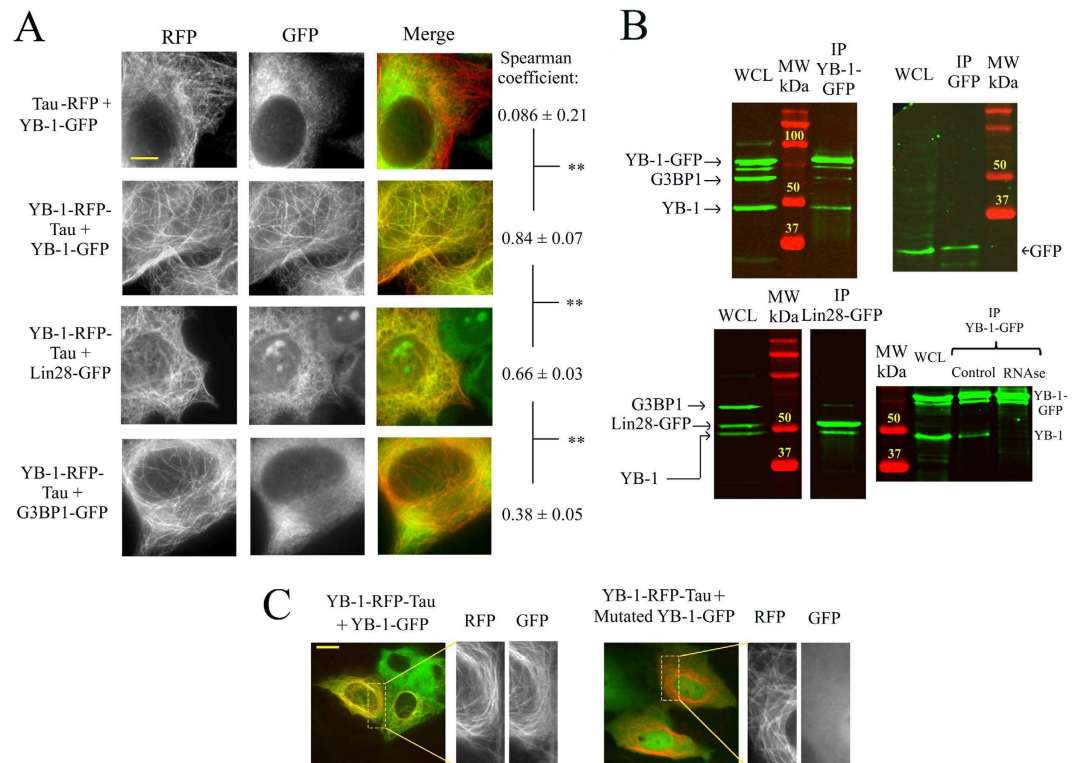


Figure 3. Detection of protein colocalization among mRNA-binding proteins and comparison to results obtained via conventional pull downs. (A) The micrographs of fixed cells show the level of colocalization of indicated baits and preys, RFP and GFP-labeled respectively. Tau-RFP is used as a control. Results are mean \pm SD ($n = 20$ cells). $**P < 0.01$, two-tailed t test. Scale bar: $15\mu\text{m}$. See Videos 1 and 2 for living cells. (B) Analysis of the interactions between YB-1, G3BP1 and Lin28 via pull down assays. Upper, left panel: western blots showing the amounts of endogenous YB-1, G3BP1 and YB-1-GFP in pull-down assays of whole cell lysate (WCL) of HeLa cells expressing YB-1-GFP. Anti-GFP antibody was used to bring YB-1-GFP to the beads. Upper, right panel: as a control, neither YB-1 nor G3BP1 were detected in pull-down assays using whole cell lysate of GFP-transfected cells. Endogenous YB-1 and G3BP1 were detected using anti-YB-1 and anti-G3BP1 antibodies. HeLa cells do not express endogenous Lin28. Lower, left panel: pull down assays in HeLa cells expressing Lin28-GFP. Lower right panel: western blots showing the amount of endogenous YB-1 and YB-1-GFP in pull-down assays of WCL of HeLa cells expressing YB-1-GFP with or without RNase treatment. RNase disrupts the interaction between YB-1-GFP and endogenous YB-1, in line with a colocalization resulting from a cooperative binding to mRNA¹⁸. (C) Videomicroscopy images of living cells. Two point mutations in the cold-shock domain disrupt YB-1-GFP colocalization with YB-1-RFP-Tau on microtubules. Scale bar: $15\mu\text{m}$.

- i) YB-1 is known to interact with itself¹⁷ and to bind to mRNA cooperatively¹⁸. As many copies of this protein should be interacting with the same mRNA due to its cooperative binding, we thus expect a strong colocalization between YB-1-RFP-Tau and YB-1-GFP on microtubules.
- ii) G3BP1 has no known interaction with YB-1. In addition, none of the top 25 mRNA targets of G3BP1¹⁹ were found among the top 100 mRNA targets of YB-1²⁰. G3BP1 may thus poorly colocalize with YB-1-RFP-Tau on microtubules.
- ii) Lin28 (Lin28a) is a regulator of development timing. Lin28, like YB-1, binds to RNA cooperatively via its cold-shock domain^{21,22}. In addition to these similarities with YB-1, about 25% of the top 100 mRNA targets of YB-1²⁰ display at least one binding site for Lin28²³. Lin28 may thus colocalize with YB-1-RFP-Tau on microtubules.

The results indicate that, as expected, YB-1-GFP is clearly brought to microtubules in cells expressing YB-1-RFP-Tau (Fig. 3A, Video 1). In contrast, G3BP1-GFP scarcely colocalizes with YB-1-RFP-Tau under the same conditions (Fig. 3A, Video 2). Lin28-GFP is also observed on microtubules of cells expressing YB-1-RFP-Tau but to a lesser extent than YB-1-GFP. The measured colocalizations are therefore specific to the prey proteins. Interestingly, while G3BP1-RFP-Tau also brings mRNA to microtubules (Fig. 2A), it fails to do the same with YB-1-GFP, Lin28-GFP and G3BP1-GFP (Supplementary Figure S4). The detected colocalization is thus not simply governed by the presence of mRNAs on microtubules. In order to compare these results with those obtained with a more conventional method, we performed

pull-down assays. The results show that YB-1 indeed co-precipitates with itself and with Lin28 but poorly with G3BP1. In addition, we found that YB-1:YB-1 co-precipitation is RNA-dependent (Fig. 3B), in agreement with YB-1:YB-1 interactions resulting from a cooperative binding to RNA.

If we consider that the strong colocalization between YB-1-GFP and YB-1-RFP-Tau is due to the cooperative binding of YB-1 to mRNA¹⁸, the same results should be observed for Lin28 which was also reported to bind to RNA cooperatively *in vitro*²¹. We thus tested this hypothesis by using Lin28-RFP-Tau as bait and Lin28-GFP as prey. The results clearly reveal the presence of Lin28-GFP on microtubules in Lin28-RFP-Tau expressing cells (Supplementary Figure S4). In contrast, G3BP1, which does not bind to mRNA cooperatively¹⁸, poorly colocalizes with G3BP1-RFP-Tau on microtubules (Supplementary Figure S4).

The consequences of point mutations on protein interactions can be probed on a microtubule bench. One possible application of this method is to detect the consequences of point mutations on protein interactions, which could pave the way for future structural biology investigations in cells. To that end, we probed the consequence of two point mutations in the cold-shock domain of YB-1²⁴. These two mutations might play a critical role in YB-1:YB-1 interactions as shown by pull-down assays (Figure S3). We thus examined the interactions between YB-1-RFP-Tau, used as bait protein, and YB-1-GFP with or without the two mutations in the cold-shock domain²⁴, (Fig. 3C). In contrast with wild type YB-1, the results show that mutated YB-1-GFP fails to colocalize with YB-1-RFP-Tau on microtubules.

A protocol to analyze protein interactions on a microtubule bench. In order to design a protocol for measuring bait:prey interactions on microtubules, we considered that high expression levels of the bait protein may lead to false positive colocalizations. Indeed, a significant fraction of mRNA is then brought to microtubules, including non-specific mRNA targets of the bait protein. As a result, other RNA-binding proteins which do not colocalize with the bait protein under physiological conditions may be brought to microtubules artificially. To quantify such bias and discard false positive colocalizations, the spearman coefficient was measured in cells expressing both bait and prey proteins at varying levels (Fig. 4A,B). For both YB-1-RFP-Tau, Lin28-RFP-Tau and G3BP-RFP-Tau, the results indicate that the spearman coefficient increases gradually with the bait expression levels. At the highest expression levels of YB-1-RFP-Tau, the differences in the measured spearman coefficients between the three prey proteins are less marked than at low bait expression levels (Fig. 4B). This was expected on the basis of the massive binding of mRNA on microtubules after expressing YB-1-RFP-Tau at high levels (Fig. 2B). In line with this, when RFP-Tau alone was used as a control, which thus does not bring mRNA to microtubules (Fig. 4A), colocalization between YB-1-GFP and Tau-RFP remains insignificant whatever the expression level of RFP-Tau (Fig. 4B).

To avoid the bias induced by expressing the bait protein at high levels, we decided to estimate the spearman coefficient when the expression level of the bait protein is virtually zero, which corresponds to conditions found in unperturbed cells. The value of the spearman coefficients in the virtual absence of bait protein were then extrapolated from the plots of the spearman coefficient versus bait expression level (Fig. 4B). This analysis shows that, in unperturbed cells, YB-1-RFP-Tau significantly interacts with YB-1-GFP, moderately with Lin28-GFP and poorly with G3BP1-GFP.

Protein interactions can be detected during microtubule regrowth after nocodazole washout.

So far the series of experiments show that the preys, whatever they are mRNA or mRNA-binding proteins, can be brought onto the microtubule surface when a bait protein is intentionally located on microtubules. However, even by using the N-terminal domain of Tau as spacer, the vicinity of the microtubule surface may hinder native interactions between bait and prey. To overcome this possible bias, we monitored microtubule disassembly/assembly by using reversible microtubule-destabilizing drugs like nocodazole or through cold treatment. Indeed, inducing microtubule disassembly/assembly opens the opportunity to let the bait-prey partner interact freely in the cytoplasm for a chosen time interval. The bait-prey couple can then be again attracted to nascent microtubules when conditions for microtubule assembly are again favorable. As a proof of concept, microtubules were first depolymerized in the presence of nocodazole and microtubule regrowth was then triggered after nocodazole washout. Using YB-1-RFP-Tau as bait and YB-1-GFP as prey, we then detected the presence of both bait and prey proteins on growing microtubules (Fig. 5A). Time-lapse images and videos (Fig. 5B and video 3) do not reveal any delay between the appearance of YB-1-RFP-Tau and that of YB-1-GFP on microtubules.

Cx43 interacts on microtubules with a truncated form of Cx43, used as bait. We also tested whether the domain of application of the present method can be extended to proteins other than RNA-binding proteins. Cx43, a membrane protein and a member of the connexin family, was chosen because it can oligomerize into hexamers at the cell membrane to form gap junctions. Here we used as bait protein a truncated form of Cx43, DeltaCx43, in which part of the N-terminal domain has been removed (amino acids 1-146). This truncated form contains two transmembrane helices but doesn't form gap junctions²⁵ and thus was easily brought to microtubules after fusing it to Tau (Fig. 6A). We then probed whether DeltaCx43-Tau, used as bait, interacts with the full length Cx43-GFP on microtubules. In epithelial NRK cells, Cx43-GFP was located at the cell membrane and formed gap junctions (Fig. 6A). Interestingly, when NRK cells expressed the bait protein, DeltaCx43-Tau, Cx43-GFP was also found on

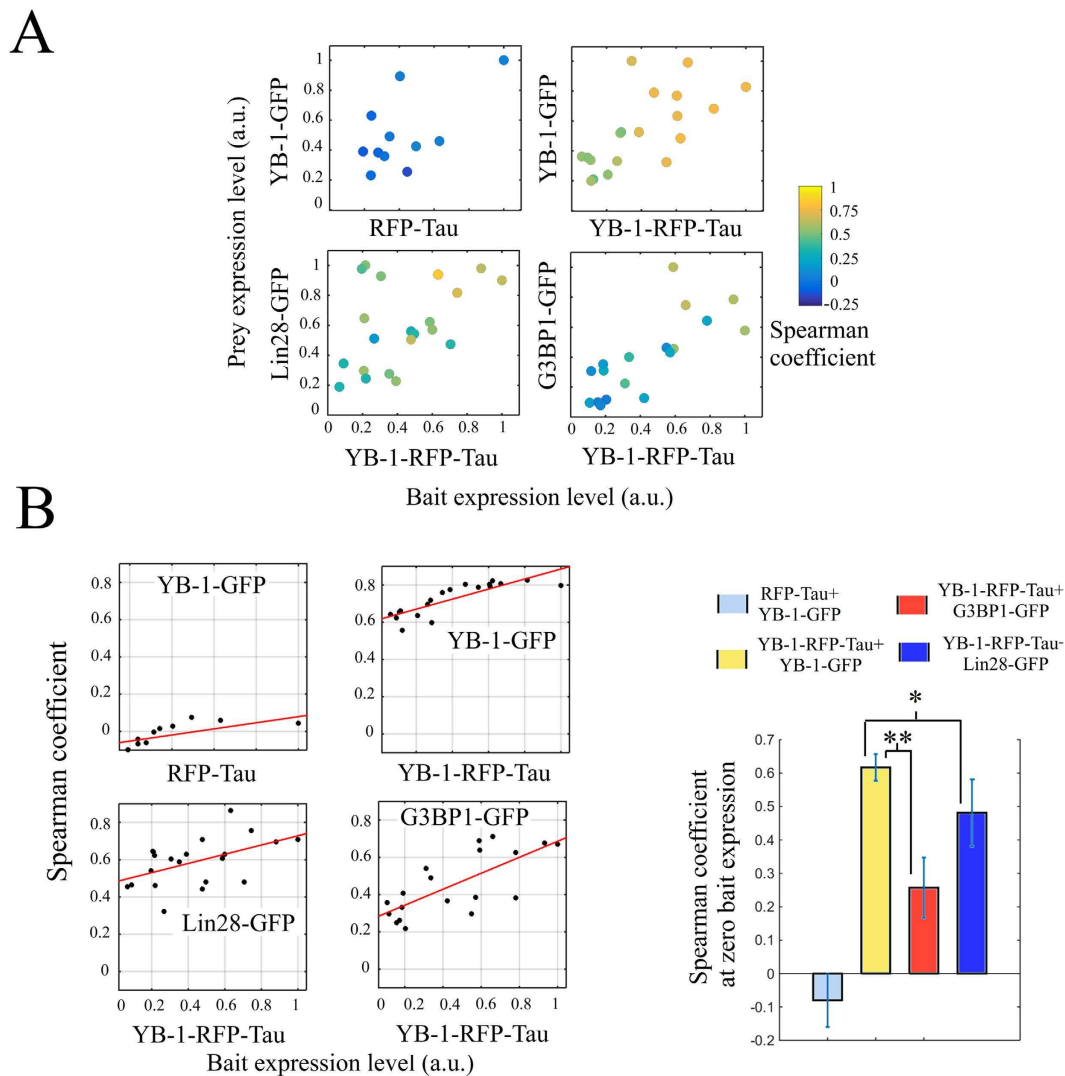


Figure 4. Statistical analysis of the colocalization events detected on microtubules. (A) 2D plot representing the spearman coefficient versus bait and prey expression levels. Each data point represents the mean value obtained on three different areas in the same cell. The color scale bar indicates the value of the spearman coefficient for each data point in the 2D plot. (B) 2D plot representing the spearman coefficient versus bait expression level when the bait expression level is virtually zero was then extrapolated using linear curve fitting. The bar plot represents the spearman coefficients extrapolated at the zero bait expression level. Results are means \pm SD and were obtained from least square interpolation of the experimental data points ($n \geq 19$ cells). ** $P < 0.01$, * $P < 0.05$, two-tailed t test.

microtubules (Fig. 6B). The presence of CX43-GFP on microtubules should thus result from an interaction between DeltaCx43 and Cx43-GFP, probably through their transmembrane helices²⁶. As a negative control, we used Claudin-10 (CLDN10), a member of the Claudin family²⁷, which forms tight junction at the interface between cells. CLDN10 is not known to interact with Cx43. In line with this, CLDN10-GFP was found at the cell membrane and failed to colocalize with DeltaCx43-Tau on microtubules.

Altogether, the results show that the present method is particularly suitable to screen putative partners of proteins having a diffuse cytoplasmic distribution. Albeit it may also apply to proteins having a non-diffuse cytoplasmic distribution and to non-cytoplasmic proteins, careful attention should be paid to avoid false positives induced by changing the natural location of proteins. In addition, only cells expressing bait protein at low level should be taken into account to avoid considering nonspecific interactions as stressed by statistical approach (Fig. 4). Further developments may concern the combination of this method with fluorescence energy transfer FRET²⁸ or split-GFP⁶ in order to determine whether the interactions taking place on the microtubule platform are direct. High throughput data can be possibly collected using this method but requires optimal lateral resolution with oil-immersed lenses to clearly distinguish microtubules in both fixed and living cells.

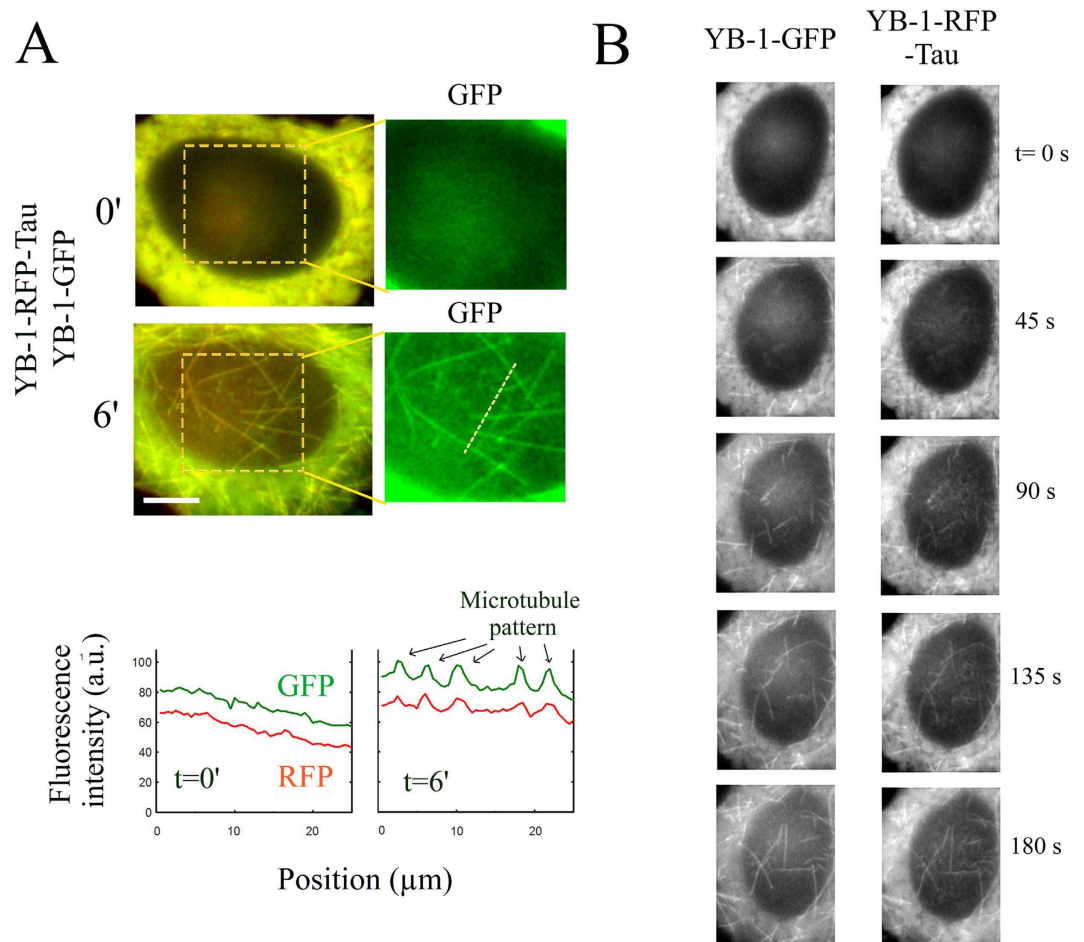


Figure 5. Detection of protein interaction in growing microtubules. (A) Upper panel: Re-growth of microtubules after nocodazole wash-out leads to the appearance of microtubule structures in both bait and prey time-lapse images. Scale bar: $15\mu\text{m}$. Lower panel: the line profile represents the fluorescence intensity along the dashed line (see upper panel) at two different times. Arrows indicate the position of five microtubules in the line profile at $t=6'$. (B) Time-lapse imaging of the reforming microtubules after nocodazole wash-out. We noticed the simultaneous presence of YB-1-GFP and YB-1-RFP-Tau on dynamical microtubules. See also video 3.

Materials and Methods

Cell culture. HeLa and NRK cells (Normal Rat Kidney cells) were obtained from the American Type Culture Collections (ATCC) and cultured at 37°C in a humidified atmosphere with $5\% \text{CO}_2$ in DMEM (Life Technologies) supplemented with $5\% \text{FBS}$ (Life Technologies). Cells were grown on 12mm round coverslips inside 24-well plates and were transfected with $2\mu\text{g}$ of indicated DNA plasmids by using Lipofectamine 2000 (Invitrogen). For videomicroscopy, cells were cultured on glass bottom dishes (MatTek Corporation). The efficiency of transfection and the integrity of the encoded proteins were controlled by immunoblotting experiments (Supplementary Figure S1B).

Molecular biology and plasmid preparation. The bait protein was fused to the longest isoform of the human Tau protein (Accession number: NP_005901.2) which has the longest N-terminal projection domain. The projection domain can possibly favor bait accessibility to preys. To explore this hypothesis, a truncated form of Tau was generated by removing the first 170 amino acids of the N-terminal tail of Tau. The Tau cDNA containing at its $5'$ end the PacI, AscI and SphI restriction sites was amplified by PCR and inserted into the Gateway pCR8/GW/TOPO entry plasmid (Invitrogen™). The resulting plasmid will be mentioned hereafter as the “backbone entry plasmid”. Human YB-1, G3BP1, Lin28 (Lin28a) and DeltaCx43 cDNAs were amplified by PCR using primers containing the PacI and AscI restriction sites and then inserted into the pCR-Blunt II-TOPO plasmid (Invitrogen™). GFP or RFP cDNAs were amplified by PCR using primers containing the AscI and SphI restriction sites and then inserted into the pCR-Blunt II-TOPO plasmid (Invitrogen™) using standard protocols. The plasmids containing all the above mentioned cDNAs were propagated and purified by Thermo Scientific Mini Kit (reference K0503) and the inserted cDNAs were verified by sequencing. Human YB-1, G3BP1, Lin28 and DeltaCx43 cDNAs

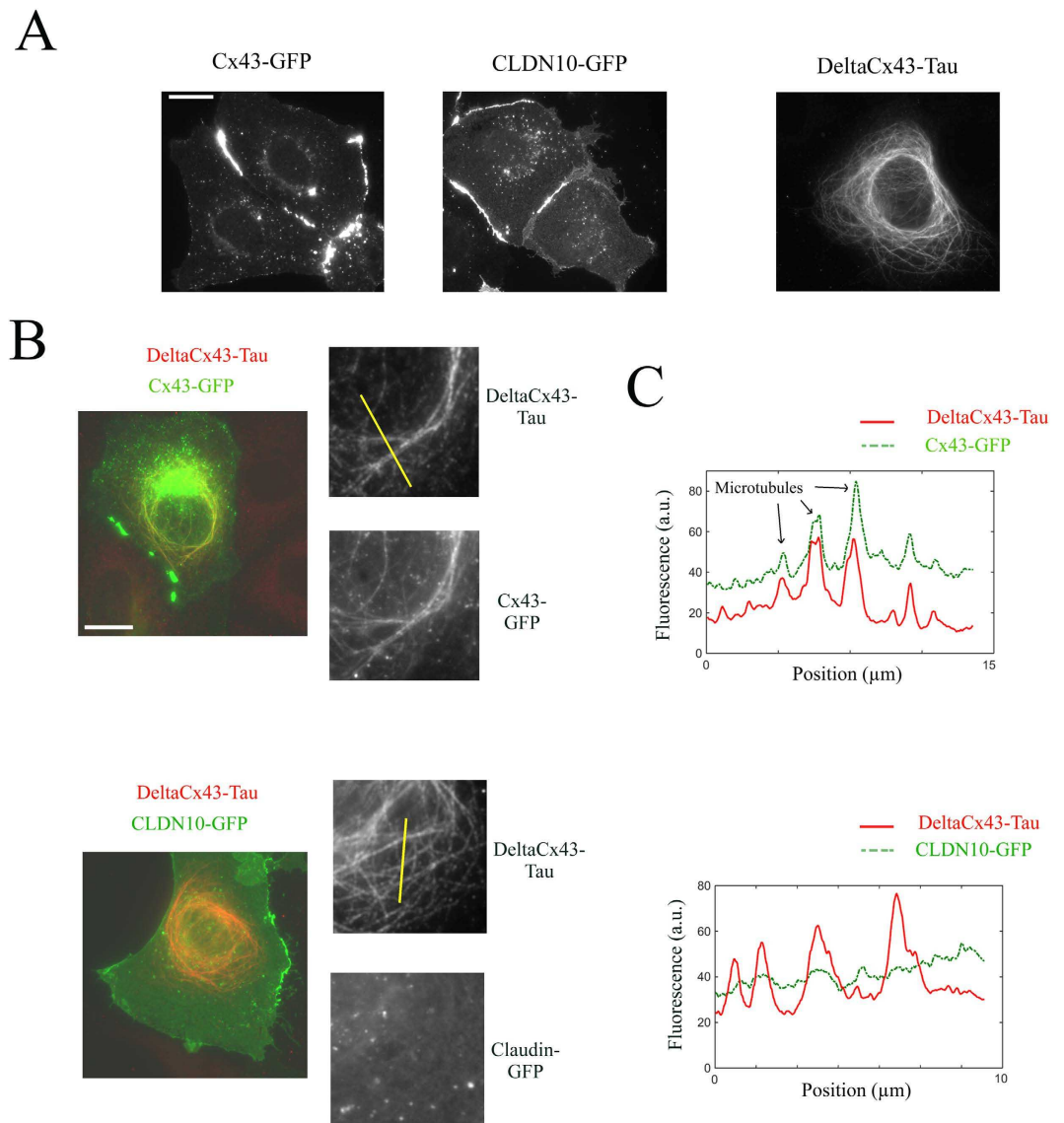


Figure 6. Interactions between membrane proteins on a microtubule bench. (A) Spatial distribution of Cx43-GFP, CLDN10-GFP (Claudin-10) and DeltaCx43-Tau (amino acids 147–382 of Cx43) in NRK cells. Both Cx43-GFP and CLDN10-GFP are located at the cell membrane interface. We also noticed that Cx43-GFP forms large gap junction plaques between cells. DeltaCx43-Tau was located on microtubules and can thus be used as bait protein. Anti-Tau was used to detect DeltaCx43-tau. Scale bar: $30\mu\text{m}$. (B) Fluorescence imaging of NRK cells expressing DeltaCx43-Tau, the truncated form of Cx43, and either Cx43-GFP or CLDN10-GFP. DeltaCx43-Tau, used as bait, is clearly brought to microtubules. Higher magnification images reveal the presence of Cx43-GFP on microtubules. In contrast, CLDN10-GFP does not colocalize with DeltaCx43-Tau on microtubules under similar conditions. NRK cells were stained with anti-Tau antibody to reveal the presence of DeltaCx43-Tau. Scale bar: $30\mu\text{m}$. (C) Representative line profiles reveal the spatial correlation between Cx43-GFP and DeltaCx43-Tau on microtubules. However, no spatial correlation was observed between CLDN10-GFP and DeltaCx43-Tau.

inserted into the pCR-Blunt II-TOPO plasmid were digested with PacI and AscI. GFP and RFP cDNAs inserted into pCRBlunt II-TOPO plasmid were digested with AscI and SphI. Ligation was performed in order to insert the above mentioned cDNA sequences into the backbone entry plasmid, previously digested with the same restriction enzymes (PacI, AscI and SphI).

The following entry plasmids were then generated:

RFP-Tau-pCR8/GW/TOPO, YB-1-RFP-Tau-pCR8/GW/TOPO, G3BP1-RFP-Tau-pCR8/GW/TOPO, Lin28-RFP-Tau-pCR8/GW/TOPO, DeltaCx43-Tau-pCR8/GW/TOPO.

The LR recombination reactions (Invitrogen™) were performed according to the manufacturer's protocol in order to transfer the cDNAs of interest from the backbone entry plasmids into the Gateway®

pEF-Dest51 plasmid (Invitrogen™) suitable for protein expression in eukaryotic cells. Finally, the following expression plasmids were also generated:

RFP-Tau-pEF-Dest51, YB-1-RFP-Tau-pEF-Dest51, Lin28-RFP-Tau-pEF-Dest51, G3BP1-RFP-Tau-pEF-Dest51, DeltaCx43-Tau-pEF-Dest51.

For the preparation of the GFP-constructs, human YB-1, G3BP1, Lin28 (Lin28a), Cx43 and CLDN10 (isoform B) cDNAs were amplified by PCR and inserted into the pEGFP-N1 plasmid (Clontech). The inserted cDNAs were verified by sequencing. The double Y72A/F74A YB-1 mutant was obtained via site-directed mutagenesis.

Fixed cell preparation. Cells growing on glass coverslips were washed with PBS, fixed with ice-cold methanol for 30 min at -20°C , washed with PBS and then further fixed with 4% paraformaldehyde (PFA) in PBS for 45 min at 37°C . This double Methanol/PFA fixation was preferred as it best reveals microtubule structures and colocalization events (Supplementary Figure S5). After final washes with PBS, samples were prepared for fluorescence microscopy imaging.

Videomicroscopy of living cells. Cells were transiently transfected with the indicated expression plasmids and then cultured for 24 h before real-time monitoring of microtubule dynamics. Fluorescence videomicroscopy was implemented on an inverted microscope (Axiovert 220; Carl Zeiss 5 MicroImaging, Inc). GFP and (or) RFP emission was detected with a $63\times/1.4\text{NA}$ objective. Time-lapse images were captured at indicated time intervals using a cooled CCD camera (Zeiss).

Image analysis and Statistics. Cells were co-transfected and analyzed after 36 h when expressing both bait and prey tagged with two different fluorescent labels, RFP and GFP, respectively. Only cells with a healthy appearance were selected for the statistics. In the case of cells expressing G3BP1-GFP, cells displaying stress granules were discarded. This occurs at high expression level of G3BP1-GFP. We also paid attention to obtain optimal resolution conditions and to select cells in which microtubules were clearly distinguished using the bait's fluorescence as the signal. For the same series of experiment, we used the same objective lens ($100\times/1.4\text{NA}$ or $65\times/1.4\text{NA}$ for fixed and living cells respectively). At this stage, we analyzed whether, although using achromatic lenses, the red and green images were not shifted with respect to each other. Such shift, if any, can be corrected using the ImageJ's Plug-In, "Align RGB planes" (Supplementary Figure S6). To quantify the colocalization level between a protein bait fused to Tau and putative protein preys, we adapted a method previously described¹⁶. Both images were then filtered using a FFT high pass filter to remove spatial frequencies which are not relevant to microtubule structures (larger structures than $2\mu\text{m}$). Images of the bait and the prey were then merged into a single green-red image. Then, the ImageJ's plug-in, "PSC Colocalization", was used to measure the spearman's coefficient, in three different regions of interest (ROI) for the same cell where microtubules were clearly observed in the bait image (Supplementary Figure S6). The area of the ROI was fixed to avoid any bias due to the surface considered to measure the correlation coefficient. We controlled that all the experimental results presented in this article were reproducible by performing each experiment in triplicate. To extrapolate the value of the spearman coefficient at the zero expression level of the protein bait, we used the least square method and a linear curve fitting.

Microtubule regrowth assay. Cells were placed on ice for 30 min to totally dissociate microtubules into tubulin heterodimers and then warmed-up at 37°C in the presence of 300 nM nocodazole. Nocodazole was then washed out from the culture medium. After nocodazole removal, *de novo* microtubule elongation started from the centrosomal area.

RNA hybridization *in situ*. *In situ* hybridization was performed to reveal Poly(A) mRNA and the 40S or 80S ribosomal subunits in HeLa cells as follows. Cells were fixed with cold methanol and then with PFA at 37°C . Cells were incubated with 100% ice-cold methanol for 15 minutes at -20°C , after that in ice-cold 70% ethanol for 10 minutes at -20°C , and then 1 M Tris pH 8 for 5 minutes, before addition of a Cy2-conjugated oligonucleotides (Sigma) at $1\mu\text{g}/\mu\text{L}$ in the hybridization buffer (0.005% BSA, 1 mg/mL yeast RNA, 10% dextran sulphate, 25% formamide in 2XSSC). 40 nucleotides Poly(T), 5'-AAGGATTTAA-AGTGGACTCATTCCAATTAC and 5'GGAT-TCTGACTTAGAGGCGTTCAGTCATAA probes, were used to detect mRNA and the 18S (40S subunit) and 28S (80S subunit) rRNA in cells respectively. Slides were then placed in a humidity chamber for 1 h at 37°C with gentle shaking. Following hybridization, cells were washed twice with 4X SSC and once with 2XSSC.

Pull down assays. The co-immunoprecipitation assays were performed using Dynabeads® Protein G Kit (Invitrogen, cat n° 10007D). HeLa cells were transiently transfected with YB-1-GFP, Lin28-GFP and GFP as a control. After 24 h the cells were rinsed with ice-cold PBS, incubated on ice in cell lysis buffer (25 mM Tris, 150 mM NaCl, 1 mM EDTA, complete Protease Inhibitor Cocktail and 1% Triton-X, pH 7.4) for 15 minutes, then scraped off the plates and centrifuged for 20 minutes at $15,000\times g$, 4°C . Aliquots of $25\mu\text{L}$ of the whole cell lysate (WCL) of YB-1-GFP, Lin28-GFP and GFP were analyzed by Western blotting. $200\mu\text{L}$ of cell lysate (1 mg/ml proteins content), $2\mu\text{g}$ mouse antiGFP primary antibody (ROCHE,

11814460001) and 50 μ L Dynabeads[®] Protein G were mixed and incubated with gentle rocking overnight at 4°C. The next day, the Dynabeads-Ab-Ag complexes were washed once with 200 μ L lysis buffer, twice with 200 μ L washing buffer (Citrate-Phosphate buffer, pH 5.0), then resuspended in 100 μ L washing buffer and transferred to clean tubes in order to avoid co-elution of proteins bound to the tube wall. The Target Antigens (YB-1-GFP, Lin28-GFP and GFP) were eluted in 20 μ L of elution buffer (0.1 M citrate, pH 2-3) and the pH of the eluates was adjusted by adding 1 M Tris, pH 7.5.

Endogenous YB-1 and G3BP1 were detected using anti-YB-1 and anti-G3BP1 (Sigma-Aldrich, G6046) antibodies. Anti-GFP (Thermo Scientific, PA1-980A) was used to detect YB-1-GFP and Lin28-GFP. Lin28 is not expressed endogenously in HeLa cells. The Precision Plus Protein Kaleidoscope standards (Bio-Rad, 161-0375) was used to determine the molecular weights of the following proteins: endogenous YB-1 and G3BP1, YB-1-GFP and Lin28-GFP.

References

- Chen, Y. C., Rajagopala, S. V., Stellberger, T. & Uetz, P. Exhaustive benchmarking of the yeast two-hybrid system. *Nature Methods* **7**, 667–668; author reply 668 (2010).
- Rual, J. F. *et al.* Towards a proteome-scale map of the human protein-protein interaction network. *Nature* **437**, 1173–1178 (2005).
- Gavin, A. C., Maeda, K. & Kuhner, S. Recent advances in charting protein-protein interaction: mass spectrometry-based approaches. *Current opinion in biotechnology* **22**, 42–49 (2011).
- Setou, M., Nakagawa, T., Seog, D. H. & Hirokawa, N. Kinesin superfamily motor protein KIF17 and mLin-10 in NMDA receptor-containing vesicle transport. *Science* **288**, 1796–1802 (2000).
- Soderberg, O. *et al.* Direct observation of individual endogenous protein complexes *in situ* by proximity ligation. *Nature Methods* **3**, 995–1000 (2006).
- Cabantous, S. *et al.* A new protein-protein interaction sensor based on tripartite split-GFP association. *Scientific Reports* **3**, 2854 (2013).
- Sekar, R. B. & Periasamy, A. Fluorescence resonance energy transfer (FRET) microscopy imaging of live cell protein localizations. *The Journal of Cell Biology* **160**, 629–633 (2003).
- Li, H., DeRosier, D. J., Nicholson, W. V., Nogales, E. & Downing, K. H. Microtubule structure at 8 Å resolution. *Structure* **10**, 1317–1328 (2002).
- Desai, A. & Mitchison, T. J. Microtubule polymerization dynamics. *Annual Review of Cell and Developmental Biology* **13**, 83–117 (1997).
- Himmler, A., Drechsel, D., Kirschner, M. W. & Martin, D. W., Jr. Tau consists of a set of proteins with repeated C-terminal microtubule-binding domains and variable N-terminal domains. *Molecular and Cellular Biology* **9**, 1381–1388 (1989).
- Evdokimova, V. *et al.* Translational activation of snail1 and other developmentally regulated transcription factors by YB-1 promotes an epithelial-mesenchymal transition. *Cancer Cell* **15**, 402–415 (2009).
- Ortega, A. D., Willers, I. M., Sala, S. & Cuezva, J. M. Human G3BP1 interacts with beta-F1-ATPase mRNA and inhibits its translation. *Journal of Cell Science* **123**, 2685–2696 (2010).
- Skabkin, M. A. *et al.* Structural organization of mRNA complexes with major core mRNP protein YB-1. *Nucleic Acids Research* **32**, 5621–5635 (2004).
- Adler, J. & Parmryd, I. Quantifying colocalization by correlation: the Pearson correlation coefficient is superior to the Mander's overlap coefficient. *Cytometry. Part A: The Journal of the International Society for Analytical Cytology* **77**, 733–742 (2010).
- Adler, J., Pagakis, S. N. & Parmryd, I. Replicate-based noise corrected correlation for accurate measurements of colocalization. *Journal of Microscopy* **230**, 121–133 (2008).
- French, A. P., Mills, S., Swarup, R., Bennett, M. J. & Pridmore, T. P. Colocalization of fluorescent markers in confocal microscope images of plant cells. *Nature Protocols* **3**, 619–628 (2008).
- Ashizuka, M. *et al.* Novel translational control through an iron-responsive element by interaction of multifunctional protein YB-1 and IRP2. *Molecular and Cellular Biology* **22**, 6375–6383 (2002).
- Kretov, D. A. *et al.* mRNA and DNA selection via protein multimerization: YB-1 as a case study. *Nucleic acids research* **43**, 9457–9473 (2015).
- Irvine, K., Stirling, R., Hume, D. & Kennedy, D. Rasputin, more promiscuous than ever: a review of G3BP. *The International Journal of Developmental Biology* **48**, 1065–1077 (2004).
- Dong, J. *et al.* RNA-binding specificity of Y-box protein 1. *RNA Biol* **6**, 59–64 (2009).
- Mayr, F., Schutz, A., Doge, N. & Heinemann, U. The Lin28 cold-shock domain remodels pre-let-7 microRNA. *Nucleic Acids Research* **40**, 7492–7506 (2012).
- Jiang, W., Hou, Y. & Inouye, M. CspA, the major cold-shock protein of Escherichia coli, is an RNA chaperone. *The Journal of Biological Chemistry* **272**, 196–202 (1997).
- Hafner, M. *et al.* Identification of mRNAs bound and regulated by human LIN28 proteins and molecular requirements for RNA recognition. *RNA* **19**, 613–626 (2013).
- Evdokimova, V. *et al.* The major mRNA-associated protein YB-1 is a potent 5' cap-dependent mRNA stabilizer. *EMBO J* **20**, 5491–5502 (2001).
- Zhang, Y. W., Kaneda, M. & Morita, I. The gap junction-independent tumor-suppressing effect of connexin 43. *The Journal of Biological Chemistry* **278**, 44852–44856 (2003).
- Yeager, M. & Harris, A. L. Gap junction channel structure in the early 21st century: facts and fantasies. *Current Opinion in Cell Biology* **19**, 521–528 (2007).
- Lal-Nag, M. & Morin, P. J. The claudins. *Genome Biol* **10**, 235 (2009).
- Kenworthy, A. K. Imaging protein-protein interactions using fluorescence resonance energy transfer microscopy. *Methods* **24**, 289–296 (2001).

Acknowledgements

We gratefully acknowledge the Genopole Evry and INSERM for constant support of the laboratory. We also thank Michel Cailleret for his participation to the design of the Tau constructs.

Author Contributions

M.B. planned and performed molecular and cellular biology experiments and analyzed the data. D.K. prepared the plasmids encoding YB-1 constructs and analyzed the data regarding YB-1:mRNA

interactions. B.D. performed immunofluorescence experiments. A.M.-G. participated to the preparation of plasmids encoding Tau constructs. P.A.C. analyzed the data and provided his expertise in microtubule dynamics. D.P. planned the experiments and wrote the manuscript.

Additional Information

Supplementary information accompanies this paper at <http://www.nature.com/srep>

Competing financial interests: M.B., P.A.C. and D.P. filed an European patent application (EP14306190) for the detection of protein interactions in cells using microtubules as platforms. The other authors declare that no competing interests exist.

How to cite this article: Boca, M. *et al.* Probing protein interactions in living mammalian cells on a microtubule bench. *Sci. Rep.* **5**, 17304; doi: 10.1038/srep17304 (2015).



This work is licensed under a Creative Commons Attribution 4.0 International License. The images or other third party material in this article are included in the article's Creative Commons license, unless indicated otherwise in the credit line; if the material is not included under the Creative Commons license, users will need to obtain permission from the license holder to reproduce the material. To view a copy of this license, visit <http://creativecommons.org/licenses/by/4.0/>

Résumé/Abstract

Titre : Structure et dynamique des faisceaux de microtubules : Implication de la protéine Tau

Mots clés : Tau, microtubules, axone, encombrement macromoléculaire, dégénérescence axonale, faisceaux.

Résumé : Le long de l'axone d'un neurone mature, les microtubules (MTs) sont organisés en faisceaux parallèles et orientés. Cette géométrie devrait en théorie favoriser la formation de faisceaux serrés de MTs par encombrement macromoléculaire au sein de l'axoplasme (distance interMT < 5nm). Or, des images de coupes d'axones obtenues par microscopie électronique ont révélé qu'ils y étaient bien séparés (distance interMT \approx 75 nm). Dans la littérature, cette singularité pourrait s'expliquer par la présence de Tau, une protéine associée aux MTs. Cependant, l'effet de Tau sur l'organisation de MTs est encore sujet à controverse car deux modèles antagonistes ont été proposés. Le premier modèle avance que les domaines de projection de Tau connectent les MTs tout en les maintenant espacés en formant des ponts d'origine électrostatiques, à l'inverse du second qui explique l'espacement des MTs par un effet de « polymer brush » dû à la présence de Tau à la surface du MT. Afin d'éclairer la fonction de Tau dans l'organisation des MTs, nous avons combiné des approches expérimentales à différentes échelles, *in vitro* et *in cellulo*, avec des données issues de la modélisation analytique et numérique. Les résultats obtenus nous ont permis de proposer un modèle alternatif où la protéine Tau formerait des ponts transitoires. Ces derniers permettraient de maintenir les MTs suffisamment éloignés les uns des autres afin d'éviter l'effet de forces attractives à courte portée qui déclencheraient une mise en faisceau irréversible des MTs. Enfin, notre modèle tient compte de la faible densité de Tau sur la surface des MTs. En effet, même à un bas ratio molaire Tau:Tubuline, Tau permet de garder les MTs éloignés les uns des autres grâce à la mobilité relative de Tau sur les MTs.

Title: Dynamical behavior of microtubule bundles in the presence of Tau

Keywords: Tau, microtubules, axon, macromolecular crowding, axonal degeneration, bundles.

Abstract: In mature neurons, axonal microtubules (MTs) are arranged in parallel arrays. Interestingly, even though both macromolecular crowding and their parallel orientation should force the formation of tightly packed bundles, they remain well separated. For decades, Tau, a microtubule-associated protein, has been implicated in this unique organization of axonal MTs. However, Tau properties still remain controversial as two antagonist models of interaction with MTs exist. Tau projection domains are either thought to connect MTs by forming electrostatic cross-bridges or to repulse them via a polymer brush mechanism. To gain a comprehensive view of Tau function, we then performed *in vitro* and in cells experiments, combined to analytical and mathematical modelling. We also reviewed the data traditionally used to support the cross-bridging and the polymer brush models and compared them with our interdisciplinary approach. Taken together, these results are indicating that tau can form transient and long-range cross-bridges at the interface between microtubules. These cross-bridges could prevent short-range attractive interactions that trigger an irreversible microtubule bundling. Finally, our model explain how MTs are kept apart at very low Tau:Tubulin molar ratio thanks to tau diffusion on microtubules.